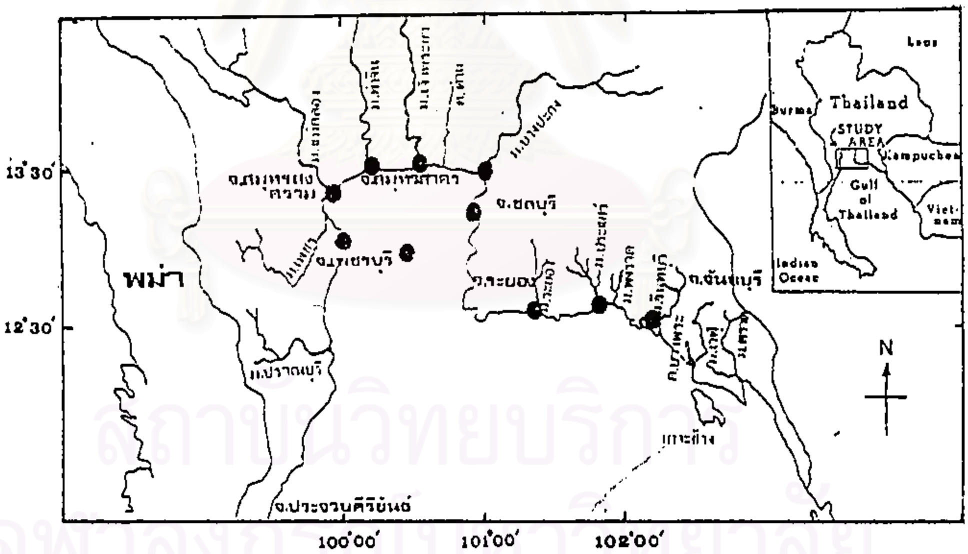
บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษาสัณฐานวิทยาและการสร้างพิษของ *Alexandrium* บริเวณอ่าวไทยตอนบนครั้งนี้ ประกอบด้วยการทำการศึกษา 2 ส่วน และแบ่งวิธีการศึกษาออกเป็น 7 ขั้นตอน โดยส่วนแรกเป็นส่วนของการศึกษาในภาคสนามมี 2 ขั้นตอน และส่วนที่สองเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การศึกษาในภาคสนาม

บริเวณที่ทำการศึกษาได้แก่ บริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ บ่อเลี้ยงสัตว์น้ำและทางระบายน้ำเข้าออกของบ่อเลี้ยงในเขตจังหวัดที่มีพื้นที่ติดต่อกับชายฝั่งรอบอ่าวไทยตอนบนได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง และจันทบุรี รวมทั้งบริเวณร่องน้ำที่พาดผ่านตั้งแต่เขตอำเภอมาบตาพุด จังหวัดระยองทางฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนไปยังฝั่งตะวันตกในเขตอำเภอหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี ดังรูปที่ 11 และภาคผนวก ก.



รูปที่ 11 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง

1.1 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชในบริเวณที่ทำการศึกษาด้วยถุงลากแพลงก์ตอนที่มีขนาดตา 20 ไมครอน โดยในบริเวณชายฝั่งและทะเลที่มีระดับน้ำลึกกว่า 5 เมตร จะลากถุงแพลงก์ตอนทั้งในแนวดิ่งและแนวนอนเพื่อให้ได้ปริมาณและชนิดของแพลงก์ตอนพืชมากที่สุด ส่วนในบริเวณบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำจะใช้ถังตักน้ำในระดับต่ำกว่าผิวหน้าน้ำประมาณ 50 เซนติเมตร แล้วนำมากรองผ่านถุงกรอง

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แพลงก์ตอนพืชที่มีขนาดตา 20 ไมครอนเช่นเดียวกัน ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกเก็บรักษาให้อยู่ในสภาพที่มีชีวิตสำหรับใช้ในการคัดเลือกเซลล์และเพาะเลี้ยงแบบ monoclonal culture ต่อไป สำหรับส่วนที่สองจะถูกตรึงสภาพด้วยฟอร์มาลิน หรือ glutaraldehyde ที่ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 4 และร้อยละ 1.5 ตามลำดับ

1.2 การเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำ

ตรวจวัดข้อมูลคุณภาพน้ำเบื้องต้นได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิ และความเป็นกรด-เบสในแต่ละจุดเก็บ พร้อมทั้งเก็บน้ำที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษชนิด GF/C เพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักที่ละลายน้ำ เช่น ไนเตรด และฟอสเฟต ตามวิธีของ Strickland และ Parson (1972)

2. การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

สถานที่ที่ใช้ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการได้แก่ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการกลุ่มเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

2.1 การคัดเลือกเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงแบบ monoclonal culture

นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชมาคัดเลือกเซลล์ที่มีรูปร่างคล้าย *Alexandrium* ด้วยเทคนิคหลอดแก้วปลายแหลมตามวิธีของ Hoshow และ Rosowski (1973) และล้างเซลล์ทีละเซลล์เป็นจำนวน 5 ครั้ง เพื่อขจัดแบคทีเรียที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร T1 (Ogata *et al.*, 1987) (ภาคผนวก ข.) ซึ่งเตรียมโดยนำน้ำตัวอย่างมากรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดตา 0.22 ไมครอน แล้วเติมสารอาหารสูตร T1 ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป จากนั้นดูดเซลล์ที่ล้างแล้วใส่ลงในจานหลุมพลาสติก (24-well microtiter plate) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร T1 บรรจุอยู่ หลุมละ 1 เซลล์ แล้วนำเข้าบ่มในตู้เพาะบ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ และ light : dark cycle เท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง สังเกตการเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ จนกระทั่งมีจำนวนเซลล์ในหลุมมากพอที่จะถ่ายเซลล์ไปยังหลอดทดลองและขวดก้นกลมเพื่อใช้เป็น stock culture และเก็บรักษาไว้ในตู้เพาะบ่มเชื้อ

2.2 การตรวจยืนยันในระดับสกุลของ culture ที่เพาะเลี้ยง

นำตัวอย่างเซลล์จาก culture ที่เพาะเลี้ยงได้ในรุ่นแรก ๆ มาตรวจยืนยันในระดับสกุล *Alexandrium* โดยอาศัยการจัดเรียงตัวของแผ่นเปลือกหุ้มเซลล์ ด้วยวิธีการแยกแผ่นเปลือกหุ้มเซลล์และย้อมสีแผ่นเปลือกของ Fukuyo และ Imamura (1987) มีรายละเอียดดังนี้

2.2.1 หยดน้ำทะเลกรอง 1 หยดลงบนกระจกสไลด์แล้วดูดตัวอย่างเซลล์ที่ต้องการดู plate configuration จาก stock culture ด้วย pasture pipette ไปหยดลงบนหยดน้ำ จากนั้นปิด cover glass ทับลงบนหยดน้ำนั้น

2.2.2 กด cover glass เบา ๆ ด้วยความระมัดระวังโดยใช้เข็มเขี่ย เพื่อแยกกลุ่มของ

แผ่นเปลือกออกจากโปรโตพลาสซึม

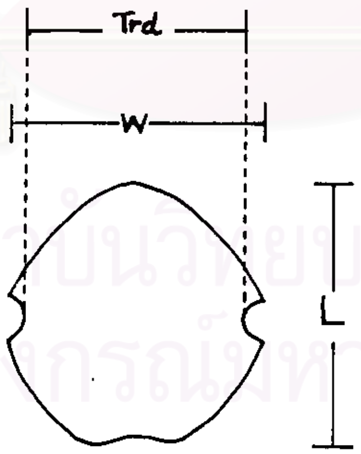
2.2.3 ถ้าแผ่นเปลือกแยกออกจากโปรโตพลาสซึมยากใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้นร้อยละ 5 หยดลงไปบนขอบของ cover glass แล้วจึงใช้เข็มเขี่ยกดเบา ๆ

2.2.4 ถ้าแผ่นเปลือกบาง และยากแก่การมองเห็น อาจใช้การย้อมสีแผ่นเปลือกเข้าช่วยโดยใช้สีย้อมแผ่นเปลือกของไดโนแฟลกเจลเลตซึ่งประกอบด้วยไอโอดีน 2.6 กรัม โปแตสเซียมไอโอไดด์ 5 กรัม และคลอรอลไฮเดรต 4 กรัม นำมาละลายน้ำกลั่นและทำให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทั้งนี้การทำ thecal dissociation จะต้องทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายประมาณ 40 ถึง 100 เท่า

เมื่อทราบอย่างแน่ชัดแล้วว่าโคลนใดเป็น *Alexandrium* จึงได้คัดเลือก monoclonal culture โคลนที่มีการเติบโตดีที่สุดเพื่อใช้เป็นตัวแทนของแต่ละจุดเก็บ ๆ ละ 1 โคลนนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.3 การศึกษาขนาดของเซลล์ *Alexandrium* ที่เพาะเลี้ยง

สุ่มเซลล์ *Alexandrium* ที่เพาะเลี้ยงในแต่ละ stock culture ที่ได้คัดเลือกไว้เป็นตัวแทนของแต่ละจุดเก็บ โดยสุ่มเซลล์จำนวน 50 เซลล์จากแต่ละโคลนแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ และวัดขนาดของเซลล์โดยวัดความยาวของส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ ได้แก่ ความยาวของเซลล์ซึ่งวัดจาก apex ถึง antapex (length ; L) ความกว้างของเซลล์ซึ่งวัดจากปลาย epitheca ทั้งสองข้างตรงบริเวณขอบ girdle (amplitude ; A หรือ width ; W) และความกว้างของเซลล์ที่เส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ตรงบริเวณ girdle (transversediameter ; Trd) ตามรายละเอียดที่แสดงในรูปที่ 12 โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม Image-Pro Plus version 1.3 (บริษัท Media Cybernatics) จากนั้นคำนวณค่าอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของเซลล์เพื่อใช้ประกอบการจัดกลุ่มและจำแนกชนิด



รูปที่ 12 พารามิเตอร์ทางสัณฐานวิทยาที่ใช้วัดขนาดของเซลล์

โดย L แทน ความยาวของเซลล์ ; ระยะตั้งแต่ apex ถึง antapex

W แทน ความกว้างของเซลล์ ; ระยะระหว่างปลายขอบบนของ girdle ทั้งสองข้าง

Trd แทน ความกว้างของเซลล์ ; ระยะระหว่างขอบล่างของ girdle ทั้งสองข้าง

2.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาของแผ่นเปลือกหุ้มเซลล์เพื่อจัดจำแนกชนิด (Identification)

นำเซลล์ *Alexandrium* ที่เพาะเลี้ยงในแต่ละ stock culture ที่ได้คัดเลือกไว้เป็นตัวแทนของแต่ละจุดเก็บมาศึกษาลักษณะและองค์ประกอบของแผ่นเปลือกหุ้มเซลล์ โดยสุ่มเซลล์มาจำนวน 20 เซลล์จากแต่ละโคลนของ stock culture

2.4.1 การศึกษาแผ่นเปลือกหุ้มเซลล์โดยวิธี Epifluorescence ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Fritz และTriemer (1985) มีขั้นตอนดังนี้

2.4.1.1 ตรึงสภาพเซลล์ด้วยฟอร์มาลินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 2

2.4.1.2 เติมสารละลายสารเรืองแสง calcoflour white (บริษัท Sigma Chemical) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ตรึงสภาพแล้วด้วยฟอร์มาลิน ในอัตราส่วนของสารละลาย calcoflour white 0.2 มิลลิลิตร/ปริมาตรเซลล์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นอย่างน้อยครึ่งชั่วโมงหรือขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของอากาศ และความหนาของแผ่นเปลือก

2.4.1.3 ใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่างเซลล์ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสงด้วย ไปหยดลงบนสไลด์ แล้วปิด cover glass ทับลงบนหยดน้ำนั้น ซับน้ำที่เกินออกจาก cover glass

2.4.1.4 เก็บแผ่นสไลด์ตัวอย่างไว้ในตู้เย็น (อย่าให้หยดเซลล์แห้ง) จนกว่าจะนำออกมาถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ epifluorescent ที่มีแหล่งกำเนิดแสง UV โดยที่สาร calcoflour white ที่ติดอยู่บนแผ่นเปลือกของเซลล์จะเรืองแสงสีฟ้า ทำให้สามารถศึกษาลักษณะและรายละเอียดของแผ่นเปลือกได้ จากนั้นถ่ายรูปเซลล์ไว้ศึกษาต่อไป

2.4.1.5 วาดรูปการจัดเรียงตัวและรูปร่างลักษณะของแผ่นเปลือกหุ้มเซลล์จากการฉายภาพสไลด์ไปยังฉากรับที่มีกระดาษรองสำหรับวาด

2.4.1.6 วัดขนาดของแผ่นเปลือกสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดได้แก่ APC 1', 6", S.a. และ S.p. (รูปที่ 13) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

APC วัดความยาว (L) จากขอบแผ่นเปลือกด้านบนจนถึงขอบแผ่นด้านล่าง และวัดความกว้าง (W) ตรงจุดกึ่งกลางของความยาว จากขอบด้านขวาไปจนถึงขอบด้านซ้าย

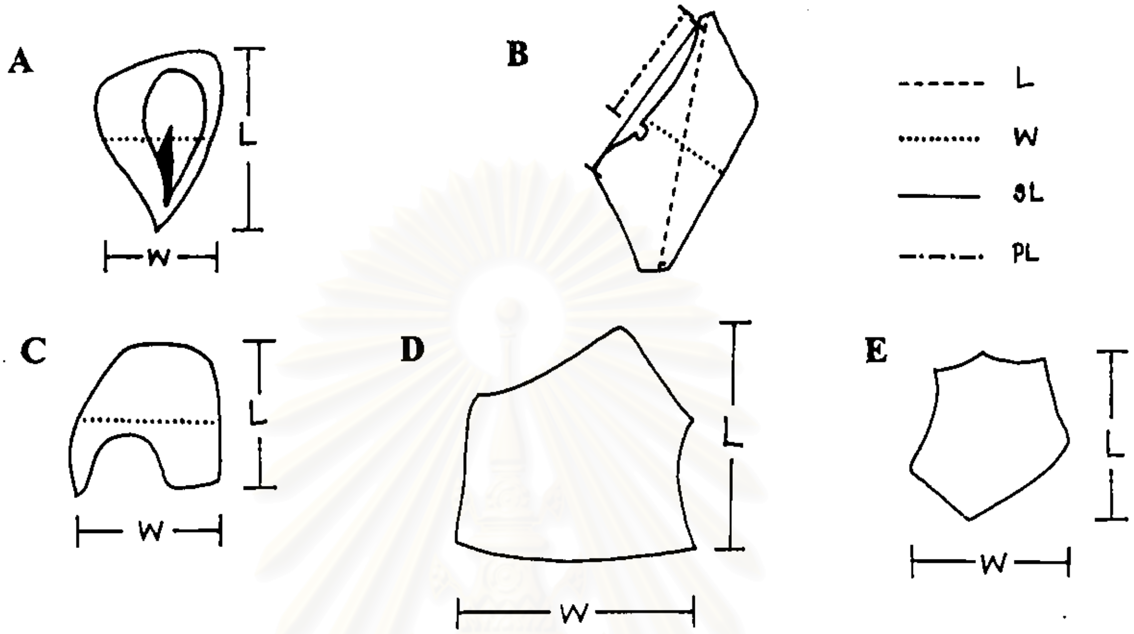
แผ่น 1' วัดความยาว (L) จากขอบแผ่นเปลือกด้านบนไปจนถึงขอบแผ่นด้านล่างและวัดความกว้าง (W) ตรงจุดกึ่งกลางของความยาว จากขอบด้านขวาไปจนถึงขอบด้านซ้าย นอกจากนี้ยังวัดความยาวของขอบด้านขวาของแผ่น (suture length ; SL) และระยะจากขอบด้านบนมายังตำแหน่งของ V.p. (pore length ; PL) แล้วนำไปคำนวณอัตราส่วนของระยะที่พบ V.p. ต่อความยาวรอยต่อของแผ่น 1' กับ แผ่น 4'

แผ่น S.a. วัดความยาว (L) จากขอบแผ่นเปลือกด้านบนจนถึงขอบแผ่นด้านล่างและวัดความกว้าง (W) ตรงจุดกึ่งกลางของความยาวจากขอบด้านขวาไปจนถึงขอบด้านซ้าย

แผ่น 6" วัดความยาว (L) จากขอบของแผ่นเปลือกด้านบนจนถึงขอบด้าน

ล่างและวัดความกว้าง (W) ตรงฐานแผ่นจากขอบด้านซ้ายไปจนถึงขอบด้านขวา

แผ่น S.p. วัดความยาว (L) จากขอบแผ่นเปลือกด้านบนจนถึงขอบแผ่นด้านล่างและวัดความกว้าง (W) ตรงจุดที่มีความกว้างมากที่สุดจากขอบด้านขวาไปจนถึงขอบด้านซ้าย



รูปที่ 13 พารามิเตอร์ทางสัณฐานวิทยาของแผ่นเปลือกต่าง ๆ ที่ศึกษา

A. APC B. แผ่นเปลือก 1' C. แผ่นเปลือก S.a.

D. แผ่นเปลือก 6'' E. แผ่นเปลือก S.p.

2.4.2 การศึกษาลักษณะแผ่นเปลือกโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Moestrup และ Thomsen (1980) ดังนี้

2.4.2.1 นำตัวอย่างเซลล์จาก stock culture มาตรึงสภาพด้วย glutaraldehyde ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 1- 2 จากนั้นเก็บทิ้งข้ามคืนไว้ในตู้เย็น

2.4.2.2 ล้างทำความสะอาดเซลล์ที่ตรึงสภาพแล้วด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง

2.4.2.3 ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยเอธานอลที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก คือ จากเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 30 , ร้อยละ 50 , ร้อยละ 70 , ร้อยละ 90 และ absolute ethanol โดยในแต่ละขั้นใช้เวลาประมาณ 15 นาที และขั้นสุดท้ายทำ 2 ซ้ำ

2.4.2.4 ดูดเซลล์ที่ผ่านการดึงน้ำออกแล้วใส่ลงในแคปซูลสำหรับทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤติ (critical point drying ; CPD) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 1100 psi เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง เพื่อให้เซลล์คงรูปร่างตามธรรมชาติ

2.4.2.5 ติดเซลล์ที่ทำแห้ง ณ จุดวิกฤติแล้วลงบนฐานยึด และฉาบผิวเซลล์ด้วย

ไมเลกุลของทอง หลังจากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสแกน (JEOL รุ่น JSM-5410 LV SCANNING MICROSCOPE) และถ่ายภาพไว้ใช้ประกอบการจัดจำแนกชนิด

เมื่อได้ข้อมูลเกี่ยวกับรูปร่างลักษณะของแผ่นเปลือกต่าง ๆ แล้ว จัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะแผ่นเปลือกของ *Alexandrium* ที่ศึกษาไว้โดย พรศิลป์ ผลพันธิน (2530), Fukuyo *et al.* (1988) และ Balech (1995)

2.5 การศึกษาอัตราการเติบโตของ *Alexandrium* ที่เพาะเลี้ยง

การศึกษาอัตราการเติบโตทำได้โดยเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร T1 ที่มีความเค็มเท่ากับความเค็มตั้งต้นของ stock culture ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งในแต่ละ culture จะเตรียมจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นถ่ายเซลล์ *Alexandrium* จาก stock culture มาใส่ลงในขวดให้มีความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 400-500 เซลล์/มิลลิลิตร แล้วสุ่มเก็บเซลล์จากทุกขวดรวมทั้ง stock culture มาขวดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำมานับจำนวนเซลล์ขณะเริ่มต้นการทดลองโดยใช้ Sedgewick Rafter Slide ที่มีความจุ 1 มิลลิลิตร นำขวด culture เข้าตู้เพาะบ่ม และสุ่มเซลล์ในเวลาเดียวกันทุกวันเพื่อนับจำนวนเซลล์ แล้วคำนวณหาความหนาแน่นของเซลล์ จากนั้นเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร) กับระยะเวลา (วัน) และคำนวณหาสัมประสิทธิ์การเติบโต (specific growth rate) จากกราฟความสัมพันธ์ที่สร้างขึ้นในช่วงที่ culture อยู่ในระยะ log phase ดังสูตร

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_o) / t$$

โดย N_o = จำนวนเซลล์เริ่มต้น (เซลล์/มิลลิลิตร)

N_t = จำนวนเซลล์สุดท้าย (เซลล์/มิลลิลิตร)

μ = สัมประสิทธิ์การเติบโต (ต่อวัน)

t = เวลาระหว่าง N_o กับ N (วัน)

2.6 การวิเคราะห์ความเป็นพิษของ *Alexandrium* ที่เพาะเลี้ยง

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของ *Alexandrium* ที่เพาะเลี้ยงสามารถสรุปได้ดังรายละเอียดต่อไปนี้ (รูปที่ 14)

2.6.1 การเตรียมเซลล์ *Alexandrium* สำหรับสกัดสารพิษ

2.6.1.1 เตรียมเพาะเลี้ยง mass culture ของโคลนต่าง ๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเป็นพิษโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร T1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ความเค็มเดียวกันกับแต่ละ stock culture ของแต่ละโคลนใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเซลล์ *Alexandrium* จาก stock culture มาใส่ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และให้มีความหนาแน่นเซลล์เพียงพอที่จะให้จำนวนเซลล์ในระยะ late log phase สำหรับสกัดพิษได้ และนำไปเก็บไว้ในตู้เพาะบ่มที่สภาวะเช่นเดิม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จนกระทั่ง culture เข้าสู่ระยะ late log phase แล้วจึงนำไปสกัดพิษต่อไป

2.6.1.2 สุ่มตัวอย่างเซลล์ในระยะ late log phase จากขวด mass culture มานับจำนวนเพื่อใช้คำนวณความเป็นพิษต่อเซลล์ แล้วแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกันโดยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บเซลล์ที่ตกตะกอนไว้

2.6.1.3 เติมสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงในเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.6.1.2 ให้มีปริมาตรรวมเป็นสองเท่าของปริมาตรเซลล์ จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

2.6.1.4 ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงนาน 10 นาที ตรวจดูเซลล์ที่แตกด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งถ้าเซลล์ยังแตกไม่หมดให้เพิ่มเวลาให้นานขึ้น

2.6.1.5 เหวี่ยงแยกสารสกัดพิษด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที จากนั้นกรองด้วยแผ่นกรองชนิด Whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บน้ำที่ผ่านกระดาษกรองไว้ทดสอบพิษ และวิเคราะห์องค์ประกอบพิษต่อไป

2.6.2 ทดสอบพิษเบื้องต้นด้วยวิธี Mouse Bioassay ตามวิธีของ AOAC (1990) ดังนี้

2.6.2.1 นำสารสกัดจากเซลล์ส่วนใสซึ่งผ่านการกรองมาทดสอบความเป็นพิษกับหนูทดลองเพศผู้ สายพันธุ์ ICR ที่มีน้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 18 - 20 กรัม โดยนำสารสกัดพิษที่ได้ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าช่องท้องของหนู (Intraperitoneal injection) พร้อมกับบันทึกเวลาที่ฉีดเสร็จไว้ (inject time) เป็น นาที : วินาที แล้วเฝ้าดูอาการจนกระทั่งหนูตายซึ่งไม่ควรเกิน 30 นาที (ถ้าเกินถือได้ว่าไม่มีพิษ) บันทึกเวลาที่หนูตายไว้

2.6.2.2 คำนวณค่าความเป็นพิษจากช่วงเวลาการตายของหนูแล้วนำไปเทียบกับตารางมาตรฐานของ Sommer สำหรับ PSP จะได้ระดับความเป็นพิษที่มีหน่วยเป็น MU/กรัม (MU : ปริมาณพิษต่ำสุดที่สามารถฆ่าหนูขาวตัวผู้ที่มีน้ำหนักตัว 20 กรัมได้ภายในเวลา 15 นาที) แล้วคำนวณเป็นหน่วย MU/เซลล์ จากจำนวนเซลล์ของ *Alexandrium* ที่ใช้ในการสกัดข้อ 2.6.1.2

2.6.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพิษ PSP ด้วยเครื่อง HPLC

เมื่อทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นในสารสกัดจากเซลล์ของแต่ละ culture ด้วยวิธี Mouse Bioassay แล้วพบว่ามีความเป็นพิษก็จะนำสารสกัดจากเซลล์เหล่านั้นมาวิเคราะห์องค์ประกอบพิษด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Oshima *et al.* (1989b), Arakawa *et al.* (1994) Arakawa *et al.* (1995) และ Oshima (1995a) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.6.3.1 นำสารสกัดที่ได้จากขั้นตอน 2.6.1.1 ถึง 2.6.1.5 มาทำให้กึ่งบริสุทธิ์โดยวิธี Ultrafiltration ด้วยเครื่องกรอง Amicon และแผ่นกรองชนิด YMI membrane ซึ่งจะแยกอนุภาคที่มีน้ำหนักต่ำกว่า 1,000 ดาลตัน (cut-off limit = 1,000 dalton) ออกมากับสารสกัดส่วนที่ผ่านแผ่นกรอง (พิษ PSP มีน้ำหนักอนุภาคประมาณ 300 ถึง 700 ดาลตัน)

2.6.3.2 นำสารสกัดที่กรองแล้วไปวิเคราะห์องค์ประกอบพิษด้วย reversed

phase HPLC ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LC-10 AD โดยใช้ column LiChroCART Superspher RP-18 (e) ขนาด 4x250 มิลลิเมตร ของบริษัท Merck และมี mobile phase ที่เป็นสารละลายผสมระหว่าง heptanesulfonic acid กับ ammonium phosphate buffer (pH 7.30) และdetection reagent (post-column) พร้อมเครื่องตรวจจับชนิด fluorescence detector (SHIMADZU) รุ่น RF-10 AXL ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 8

เซลล์ *Alexandrium* เข้มข้น 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร

| เติมกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 0.1 10 มิลลิลิตร

ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดความถี่สูง

| โฮโมจีไนซ์ในน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

เหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากสารสกัดด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที

| ส่วนใสส่วนบน

กรองสารสกัดส่วนใสให้กึ่งบริสุทธิ์ด้วยแผ่นกรอง YMI membrane

| ส่วนใสที่ผ่านแผ่นกรอง

Mouse Bioassay HPLC

รูปที่ 14 ขั้นตอนการวิเคราะห์พิษด้วยวิธี Mouse Bioassay และ HPLC

ตารางที่ 8 สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบพิษ PSP

พารามิเตอร์	สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์	
	สารพิษกลุ่ม GTXs	สารพิษกลุ่ม STXs
Column	LiChroCART Supershrer RP - 18 (e) ขนาด 4x250 mm. (Merck) , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	
Mobile phase	2 mM heptanesulfonic acid ใน 10 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.3) (flow rate 0.8 มล./นาที)	2 mM heptanesulfonic acid - 4% acetonitrile ใน 30 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.3) (flow rate 0.8 มล./นาที)
Detection reagent	A: 0.05 M periodic acid (flow rate 0.4 มล./นาที) B: 2 N KOH : 2.5 M ammonium formate : formamide ในอัตราส่วน 20 มล. : 80 มล. : 100 มล. (flow rate 0.4 มล./นาที)	
Reaction temperature	65 องศาเซลเซียส	65 องศาเซลเซียส
Detection wavelength	Exmission 336 nm. Emission 392 nm.	Exmission 336 nm. Emission 392 nm.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย