ผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษและไม่มีพิษต่อการสร้างเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย

นางสาวเบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2538

ISBN 974-632-137-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF INFUSIONS FROM TOXIC AND NONTOXIC BIVALVES ON PRODUCTIONS OF TETRODOTOXINS AND PARALYTIC SHELLFISH POISONS BY BACTERIA

MISS BENJAPHORN RUNGPHITACKCHAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1995

ISBN 974-632-137-4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษ และไม่มีพิษต่อการสร้างเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย

โดย นางสาวเบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.นิคม ชัยศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์วีระวุฒิ มหามนตรี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.นิคม ชัยศิริ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุชนา วิเศษสังข์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เบญจมาภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย : ผลของน้ำสกัดจากหอยล่องฝาชนิดมีพิษและไม่มีพิษต่อการสร้างเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย (EFFECTS OF INFUSIONS FROM TOXIC AND NONTOXIC BIVALVES ON PRODUCTIONS OF TETRODOTOXINS AND PARALYTIC SHELLFISH POISONS BY BACTERIA) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.กาญจนา จันทองจีน, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.นิคม ยัยคิร, 115 หน้า. ISBN 974-632-137-4

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่เชื้อแบคทีเรียอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัตว์ทะเลมีพิษจึงได้เลี้ยงแบคทีเรีย 3 กลุ่ม ๆ ละ 3 สายพันธุ์ คือกลุ่มที่สร้างพิษสูง กลุ่มสร้างพิษต่ำและกลุ่มไม่สร้างพิษ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ กันคือ น้ำสกัดจากหอยทรายซึ่งเป็นหอยมีพิษที่มีช่วงระยะความเป็นพิษสูง (เดือน ม.ค.-มิ.ย.) และพิษต่ำ (เดือน ก.ค.-ธ.ค.) น้ำสกัดจากหอยกระปุกและน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจซึ่งเป็นหอยไม่มีพิษ เพื่อเปรียบเทียบการสร้างสารกึ่งวางช่องโซเดียมกับการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารกึ่งวางช่องโซเดียมด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและวิเคราะห์นิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารพิษที่สร้างขึ้น โดยวิธีเอชพีแอลซี พบว่าแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงและกลุ่มสร้างพิษต่ำทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารพิษได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงและพบอนุพันธ์ที่สร้างได้สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น คืออนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซินและกลุ่มซัคซิทอกซิน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพิษอัมพาตจากหอย จากการตรวจปริมาณองค์ประกอบของน้ำสกัดชนิดต่าง ๆ พบว่าโปรตีน ไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรทมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณฟอสเฟตและกรดอะมิโนบางชนิดมีปริมาณต่ำในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูง จากการตรวจสอบทรายและน้ำทะเลที่แวดล้อมรอบหอยทรายที่เก็บตัวอย่างในระยะพิษสูง พบว่าถ้านำทรายและน้ำทะเลไปทำให้อนุภาคแตกด้วยคลื่นเสียงจะมีปริมาณสารกึ่งวางช่องโซเดียมสูงกว่าในตัวอย่างที่ไม่ได้ทำให้อนุภาคแตก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต เบญจมาภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา กาญจนา จันทองจีน

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C521071 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: : BIVALVE INFUSION / TETRODOTOXINS / PARALYTIC SHELLFISH POISONS
BENJAPHORN BUNGPHITACKCHAI : (EFFECTS OF INFUSIONS FROM TOXIC AND NONTOXIC BIVALVES ON PRODUCTIONS OF TETRODOTOXINS AND PARALYTIC SHELLFISH POISONS BY BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.KANCHANA JUNTONGJIN. Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSO.PROF.NIKOM CHAISIRI, Ph.D. 115 pp. ISBN 974-632-137-4

To study the possibility of bacterial intoxication in marine organisms, three strains from each group of high-, low- and non-toxin producing bacteria were cultivated in media containing infusions of sand clams collected during high-(Jan-June) and low-(July-Dec.) toxicity periods, non-toxic ridged venus clams, and non-toxic heart clams. Sodium channel blockers (SCB) produced by the bacteria were compared with their SCB productions in artificial liquid medium. Amount of SCB and their derivatives were determined by tissue culture assay and HPLC, respectively. Not only SCB production in six strains of high- and low-toxin producing bacteria cultivated in high toxic sand clam infusion were higher than other media but tetrodotoxin and saxitoxin, the paralytic shellfish poison derivatives, also did. Similar amounts of protein, nitrogen and carbohydrate were found in all bivalve infusions, whereas the lowest concentrations of phosphate and some amino acids were found in high toxic sand clam infusion only. SCB determination in the surrounding sand and seawater collected during high toxicity period showed that sonicated samples contained higher amounts of toxins than unsonicated samples.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต เบญจพร บุ่งพิทักษ์ไชย

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา กาญจนา จันทองจิน

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากท่านอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีนและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมรองศาสตราจารย์ ดร.นิคม ชัยศิริ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ แนวทางในการทำงานวิจัยข้อคิดเห็นตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ.ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์วีระวุฒิ มหามนตรี รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์สุชนา วิเศษสังข์ ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบรูณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Professor Masaaki Kodama Laboratory of Marine Biological Chemistry, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Sanriku,Iwate 022-01, Japan. ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์โดยวิธีเอชพีแอลซี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และกองชีวภาพกรมวิทยาศาสตร์บริการ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์การใช้เครื่องมือ ตลอดจนการอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆมา ณ.ที่นี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวก

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ได้ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ และสนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดจนครู-อาจารย์ทุกท่านที่เคยสั่งสอนมาจนงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีและสำเร็จการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

เรื่อง หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ญ

สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฏ

บทที่

1.บทนำ 1

2.อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 17

3.ผลการทดลอง 39

4.สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 70

รายการอ้างอิง 78

ภาคผนวก ก 87

ภาคผนวก ข 91

ภาคผนวก ค 98

ประวัติผู้เขียน 115

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. การเจริญ และปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (SCB) ที่สร้างจากแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว (L-medium).....40
2. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา.....47
3. ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา.....55
4. ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา.....56
5. ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบในสารสกัดจากเนื้อหอยสองฝาโดยเมทธานอลและน้ำสกัดจากหอยสองฝา.....57
6. ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบในทรายและน้ำทะเล.....57
7. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว.....60
8. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูง.....60
9. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำ.....61
10. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยกระปุก.....61
11. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจ.....62
12. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบในน้ำสกัดจากหอยทรายทั้งสองระยะ.....62
13. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบในสารสกัดจากทรายและน้ำทะเล.....62
14. สี ค่าความเป็นกรดด่างและความหนืดของน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด.....68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

15. ปริมาณโปรตีน ไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรท ไขมัน และฟอสเฟตในน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด....68
16. ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในน้ำสกัดจากหอยสองฝา....69
17. ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติของการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา....73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1. โครงสร้างทางโมเลกุลของเทโทรโดทอกซิน....4
2. โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในสารละลาย....5
3. โครงสร้างอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซิน....6
4. โครงสร้างทางโมเลกุลของซัคซิทอกซิน....10
5. โครงสร้างอนุพันธ์ของพิษอัมพาตจากหอย....11
6. โครงสร้างของช่องโซเดียมที่ถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียม....12
7. หอยทราย (sand clam, *Asaphis violascens*)....16
8. หอยกระปุก (ridged venus clam, *Tapes turgidus*)....16
9. หอยรูปหัวใจ (heart shell, *Trachycardium flavum*)....16
10. ปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสกับแอนโทรนในกรด....36
11. แผนผังระบบของเครื่อง ICP....37
12. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยทราย หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและหอยทรายมีพิษต่ำ(สกัดโดยใช้เมทธานอล)....43
13. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากทรายและน้ำทะเลที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและหอยทรายมีพิษต่ำ....43
14. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในน้ำสกัดจากหอยทราย หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและหอยทรายมีพิษต่ำ (สกัดโดยใช้น้ำทะเลสังเคราะห์)....44
15. การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา....48
16 การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา....49
17 การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา....50

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

18 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา....51
19. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา....52
20. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา....53
21. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มเทโทรโดทอกซินและสารตัวอย่าง....58
22. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มซัคซิทอกซินและสารตัวอย่าง....63
23. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มกอนิออทอกซินและสารตัวอย่าง....64
24. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มซีและสารตัวอย่าง....65
25. กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตกับปริมาณเทโทรโดทอกซิน (ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร) จากวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ....98
26. กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโบวีนซีรัมอัลบูมินกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีลอรี่....99
27. กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรทโดยวิธีแอนโทรน....100
28. ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 500 เท่า....101
29. แผนผังของเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน....104

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

ซม. = เซนติเมตร

มม. = มิลลิเมตร

°ซ = องศาเซลเซียส

% = เปอร์เซนต์

M = โมลาร์

mM = มิลลิโมลาร์

μM = ไมโครโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

สารกีดขวางช่องโซเดียม

หอยสองฝาหลายชนิดจัดเป็นอาหารที่สำคัญต่อมนุษย์ แต่อาจพบสารพิษบางชนิดในหอย โดยสารพิษที่พบนั้นอาจเกิดจากสัตว์สร้างขึ้นมาเอง หรือได้รับมาจากแหล่งภายนอกแล้วสะสมไว้โดยสารพิษนั้นไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ สำหรับสารพิษที่สำคัญกลุ่มหนึ่งคือสารกีดขวางช่องโซเดียม (sodium channel blockers, SCB) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีนและมีผลต่อระบบประสาท (nonpeptidic neurotoxin) โดยมีกลไกอย่างจำเพาะในการกีดขวางการผ่านเข้าออกของโซเดียมอิออน (Na^+) ทางช่องโซเดียมตรงบริเวณเยื่อหุ้มแอกซอนของเซลล์ประสาท (Bower et al., 1981) ทำให้ไม่เกิดกระบวนการดีโพลาไรเซชั่น (depolarization) ของการเกิดกระแสประสาทมีผลให้กล้ามเนื้อทำงานไม่ได้ เกิดเป็นอัมพาต เมื่อหมดฤทธิ์ร่างกายจะคืนสู่สภาพเดิมตามปกติ แต่ถ้าได้รับสารนี้ในปริมาณมากอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ (Kao, 1972) สารกีดขวางช่องโซเดียมประกอบด้วยสารหลายกลุ่ม แต่ที่สำคัญและศึกษากันมากมี 2 กลุ่มได้แก่ สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxins, TTXs) และสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poisons, PSPs) สารพิษทั้งสองกลุ่มนี้ประกอบด้วยอนุพันธุ์หลายชนิด ซึ่งความเป็นพิษสูงมากน้อยแตกต่างกันไป

สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxins, TTXs)

ก. ประวัติความเป็นมา

เทโทรโดทอกซินพบครั้งแรกปี คศ.1964 ในปลาวงศ์ Tetraodontiformes ซึ่งเป็นปลาจำพวกปลาปักเป้า (puffer fish) (Tsuda et al., 1964) นอกจากนี้ยังพบในปลาสกุลอื่นๆ อีก เช่นสกุล Diodontidae, Canthigasteridae และ Molidae เป็นต้น (Mosher and Fuhrman, 1984) ต่อมาพบเทโทรโดทอกซินหรือทาริคาทอกซิน (tarichatoxin) ใน California newts (*Taricha torasa*)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(Mosher et al., 1964) และสัตว์ในกลุ่มซาลามานเดอร์บางชนิด (Wakely et al., 1966) รวมทั้งพบในสัตว์อื่นๆอีกหลายชนิด ได้แก่ปลาปู่ (*Gobius criniger*) (Noguchi and Hashimoto, 1973), กบ (*Atelopus chiriquiensis*) (Kim et al., 1975; Pavelka et al., 1975) และคางคก (*Atelopus oxyrhynchus*) (Yamashita et al., 1992) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบเทโทรโดทอกซินในสัตว์ทะเลอีกหลายชนิด ได้แก่ หมึกยักษ์ (blue-ringed octopus; *Hapalochlaena maculosa*) (Sheumack et al., 1978), ivory shell (*Babylonia japonica*) (Noguchi et al., 1981), trumpet shell (*Charonia sauliae*) (Narita et al., 1981), frog shell (*Tutufa lissostoma*) (Noguchi, Maruyama et al., 1984),ปู (xantid crab; *Atergatis floridus*) (Noguchi, Uzu et al., 1984) และ lined moon shell (*Natica lineata*) (Hwang et al.,1990) เป็นต้น ในประเทศไทยพบเทโทรโดทอกซินในแมงดาทะเล (horseshoe crab; *Carcinoscorpius rotundicauda*) (Kungsuwan et al., 1988) และปลาปักเป้าน้ำจืดสกุล *Tetraodon* 2 สายพันธุ์คือ *T. fangi* (Laobhripatr et al., 1990) และ *T. palembangensis* (Saitanu et al., 1991)

การเกิดพิษในสัตว์ทะเล แต่เดิมเข้าใจว่าเกิดจากการที่สัตว์สร้างขึ้นมาเอง เพื่อใช้ในการป้องกันตัว (Fuhrman, 1986) แต่ต่อมามีหลักฐานมากมายสนับสนุนว่าสาเหตุการเกิดพิษในสัตว์ทะเลอาจเกิดมาจากแหล่งภายนอก (Hashimoto et al., 1990) เพราะสัตว์มีพิษแต่ละชนิดไม่เกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรม จึงไม่น่าเป็นลักษณะที่ควบคุมโดยยีน ซึ่งสอดคล้องกับ Yasumoto และคณะ (1986) ได้แยกเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่สร้างเทโทรโดทอกซินได้จากสาหร่ายสีแดง (*Jania* sp.) ซึ่งเป็นอาหารของปู (*Atergatis floridus*) แสดงให้เห็นว่าปูได้รับสารพิษจากสาหร่าย โดยการกินสาหร่ายเป็นอาหาร และสาหร่ายมีการสะสมพิษไว้เนื่องจากในเซลล์สาหร่ายมีแบคทีเรียสร้างพิษ ดังนั้นจึงตั้งสมมุติฐานว่าแบคทีเรียสร้างพิษเป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์ทะเลมีพิษ

Noguchi และคณะ (1986) สามารถแยกเชื้อ *Vibrio* sp. ที่สร้างเทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซินได้จากลำไส้ปู (xanthid crab; *Atergatis floridus*) คาดว่าแบคทีเรียอาจเป็นต้นกำเนิดของการสร้างเทโทรโดทอกซินในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยจะผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (food chain)

Sato และคณะ(1990) พบว่าไม่สามารถตรวจพบเทโทรโดทอกซินในปลาปักเป้าชนิดมีพิษ (*Fugu rubripes*) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (axenic culture) แต่เมื่อให้อาหารที่มีส่วนผสมของสารเทโทรโดทอกซิน จะตรวจพบเทโทรโดทอกซินได้ในปลาปักเป้า

นักวิทยาศาสตร์หลายท่านสามารถแยกแบคทีเรียที่สร้างสารพิษได้จากสัตว์ทะเลหลายชนิดทั้งชนิดที่มีพิษและไม่มีพิษ ดังนี้

Yotsu และคณะ (1987) แยกเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่สร้างเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซินได้จากบริเวณผิวหนังของปลาปักเป้าชนิดที่มีพิษ (*Fugu poecilonotus*)

Narita และคณะ (1987) แยกเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่สร้างเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์ได้จากลำไส้ของดาวทะเล (starfish; *Astropecten polyacanthus*)

Hwang และคณะ (1989) สามารถแยกแบคทีเรียที่สร้างเทโทรโดทอกซินสกุลต่างๆ ได้จากหมึกยักษ์ (blue-ringed octopus; *Octopus maculosus*) แบคทีเรียที่สร้างพิษที่แยกได้ได้แก่ สกุล *Vibrio, Alteromonas, Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

ได้มีการพบเชื้อแบคทีเรียสร้างสารเทโทรโดทอกซินในดินตะกอนจากทะเลลึก (deep-sea sediment) (Kogure et al., 1988; Do et al., 1990) และดินตะกอนจากทะเลสาบน้ำจืด (Do et al., 1993) และพบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus, Micrococcus, Acenitobacter, Aeromonas, Moraxella, Vibrio* และรวมไปถึง *Actinomycetes* (Do et al., 1991)

Simidu และคณะ (1987) นำเชื้อมาจากแหล่งเก็บรักษาเชื้อ (culture collection) และตรวจพบการสร้างเทโทรโดทอกซินในแบคทีเรียตระกูล *Vibrionaceae* ได้แก่แบคทีเรียในสกุล *Vibrio, Aeromonas, Photobacterium, Alteromonas* และ *Plesiomonas* เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่พบมากในสัตว์ทะเลและน้ำทะเล และอาจเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในสัตว์ทะเลมีพิษ จึงเป็นไปได้ที่แบคทีเรียเป็นสาเหตุของการเกิดพิษในสัตว์ทะเล โดยสันนิษฐานว่ามาจากการอาศัยอยู่รวมกัน (symbiosis) ระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษกับสัตว์มีพิษหรือสัตว์ได้รับสารพิษจากห่วงโซ่อาหาร โดยที่สารพิษนั้นไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ (Juntongjin et al., 1993)

ข. สมบัติของสาร

เทโทรโดทอกซินมีชื่อเรียกสามัญหลายชื่อ ได้แก่ มาคูโลทอกซิน(maculotoxin), สเฟียรอยดีน (spheroidine), ทาริคาทอกซิน (tarichatoxin) และพิษจากปลาปักเป้า (pufferfish poison) เป็นต้น

สูตรโมเลกุล : $C_{11}H_{17}N_3O_8$

น้ำหนักโมเลกุล : 319.28

โครงสร้างทางโมเลกุล : ประกอบด้วย คาร์บอน 41.38%, ไฮโดรเจน 5.37%, ไนโตรเจน 13.16% และออกซิเจน 40.09% (Budavari et al., 1989)

ค่าคงที่ของการแตกตัว (pKa) : ในน้ำ 8.84 และใน 50% เอทธานอล 9.54

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การละลาย (solubility): ละลายได้ดีในกรดอะซิติคเจือจางและละลายได้บางส่วนในน้ำ แอลกอฮอล์ และอีเทอร์ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น

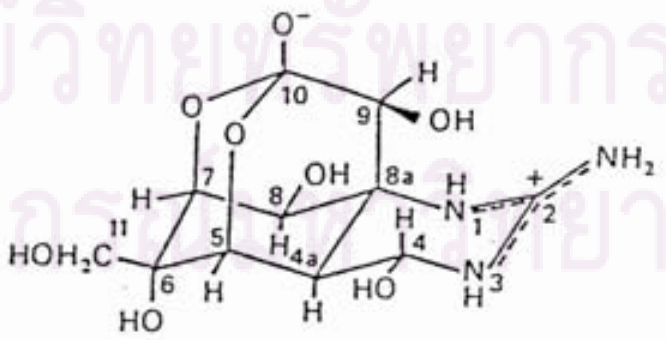
ความเสถียร (stability): ถูกทำลายได้ในกรดแก่และด่าง

ความเป็นพิษ (toxicity) : ค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าท้องหนู (mice) คือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่า LD_{50} เมื่อให้หนูกินมีค่า 322 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Evans, 1972)

สำหรับลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซินจะมีลักษณะที่เฉพาะตัว (unique structure) ซึ่งไม่พบในสารประกอบชนิดอื่นๆ โดยมีโครงสร้างแบบ iminoperhydroquinazoline ประกอบด้วยหมู่กัวนิดิเนียม (guanidinium) 1 หมู่ และพันธะเฮมิแลคตัล (hemilactal linkage) ดังแสดงโครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในรูปที่ 1.

โครงสร้างของเทโทรโดทอกซินสามารถเกิด zwitterion ที่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 10 ได้ (Bower et al., 1981) ดังแสดงในรูปที่ 2.

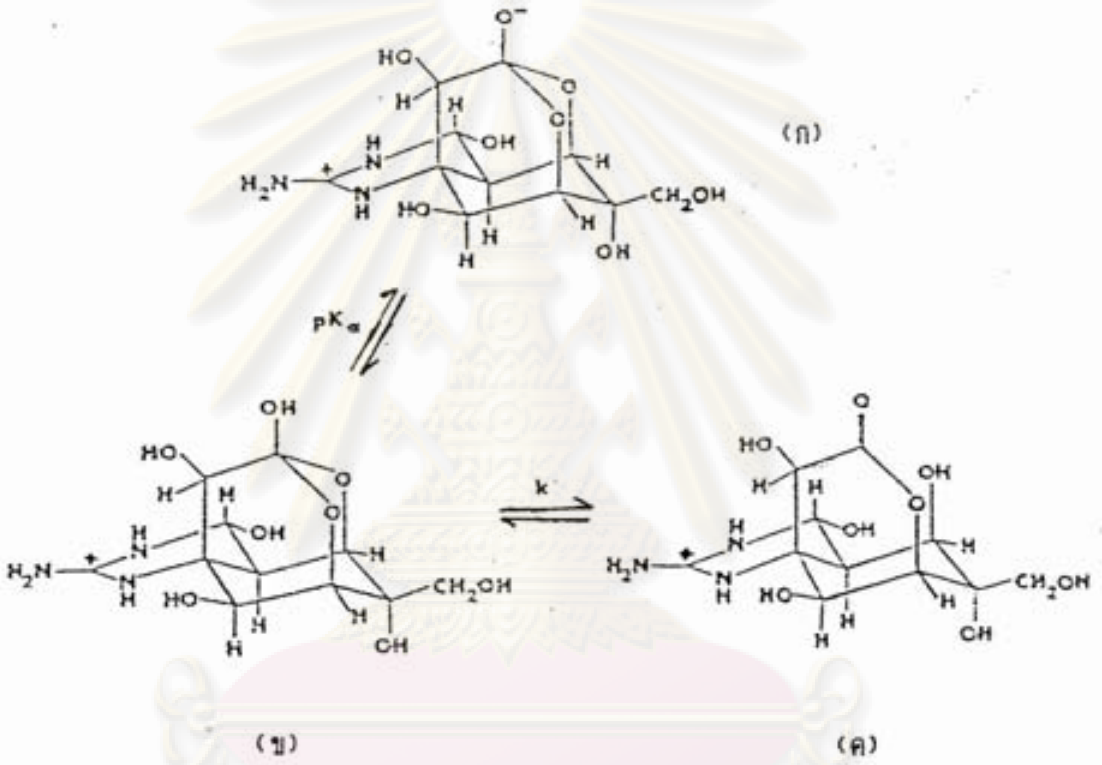
ในปัจจุบันพบอนุพันธ์ของสารในกลุ่มเทโทรโดทอกซินมากกว่า 6 อนุพันธ์ได้แก่ เทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxin;TTX), เทโทรโดนิคแอซิด (tetrodonic acid), แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน (anhydrotetrodotoxin; anh-TTX), 4-epi TTX, 6-epi TTX และ 11-deoxy TTX เป็นต้น ซึ่งแต่ละอนุพันธ์มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมได้แตกต่างกัน สำหรับอนุพันธ์ที่ทำการศึกษามากมี 4 อนุพันธ์คือ TTX ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมาคือ 4-epi TTX และ anh-TTX ตามลำดับ ส่วนเทโทรโดนิคแอซิดไม่มีความเป็นพิษ (Nagamura and Yasumoto, 1985) โดยแต่ละอนุพันธ์มีความแตกต่างกันตรงบริเวณหมู่ข้างเคียง (side-chain group) โดยมีจำนวน 4 หมู่ คือ R_1-R_4 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซินแต่ละชนิดดังรูปที่ 3.



รูปที่ 1. โครงสร้างทางโมเลกุลของเทโทรโดทอกซิน

(Kao and Walker, 1982)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในสารละลาย

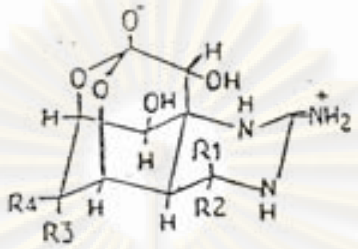
ก. cationic lactone form

ข. cationic hemilactal form

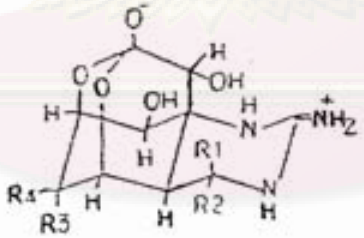
ค. zwitterionic hemilactal form

(Evans, 1972)

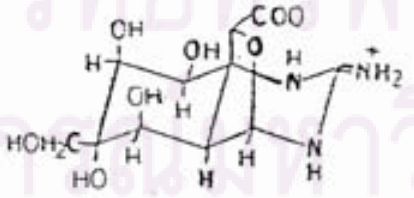
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



	R_1	R_2	R_3	R_4
tetrodotoxin	H	OH	OH	CH_2OH
4-epi tetrodotoxin	OH	H	OH	CH_2OH
6-epi tetrodotoxin	H	OH	CH_2OH	OH
11-deoxy tetrodotoxin	H	OH	OH	CH_3



anhydrotetrodotoxin



tetrodonic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3. โครงสร้างอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซิน

(Nagashima et al., 1988)

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poisons, PSPs)

ก. ประวัติความเป็นมา

พิษอัมพาตจากหอยจัดเป็นสารกึดขวางช่องโซเดียมประเภทหนึ่ง ซึ่งมีอนุพันธ์ที่สำคัญหลายกลุ่ม แต่ที่ศึกษากันมากมี 2 กลุ่ม คืออนุพันธ์กลุ่มซัคซิทอกซิน (saxitoxins, STXs) และอนุพันธ์กลุ่มกอนิออทอกซิน (gonyaytoxins, GTXs) พบครั้งแรกในหอยสองฝา (butter clam; *Saxidomus giganteus*) (Kao and Nishiyama et al., 1965) ต่อมาพบสารพิษนี้ในไดโนแฟลกเจลเลตบางชนิด ซึ่งเป็นไดโนแฟลกเจลเลตสกุล *Gonyaulax* (Proctor et al., 1975) หรือสกุล *Protogonyaulax* ต่อมาเปลี่ยนชื่อสกุลเป็น *Alexandrium* (Shimizu et al.,1990) ไดโนแฟลกเจลเลตที่พบว่ามีสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยคือ *A. tamarense, A. catenella* (Harada et al., 1982) และ *Gymnodinium catenatum* (Oshima et al., 1987) และพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae)(Kodama, Noguchi et al., 1983) นอกจากนี้ยังพบพิษอัมพาตจากหอยในสัตว์ทะเลหลายชนิด ได้แก่หอยสองฝา (soft shell clam; *Mya arenaria*) (Shimizu et al., 1975), หอยประเภทหอยแมลงภู่ (*Mytilus* sp.) (Shimizu et al., 1978), California sea-mussel (*Mytilus californianus*) (Bower et al.,1981) และหอยสองฝาชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด (Kamiya and Hashimoto, 1978) รวมไปถึงปลาปักเป้าชนิดที่มีพิษ (*Takifugu pardalis*) (Kodama, Ogata, 1983) และปู (xanthid crab; *Zosimus aeneus*) (Noguchi et al., 1985)

เมื่อมีการศึกษาต่อมาพบว่าสาเหตุที่ทำให้สัตว์ทะเลมีพิษอาจเนื่องมาจากสัตว์มีการกินไดโนแฟลกเจลเลตที่มีพิษเข้าไปในขณะเกิดการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของไดโนแฟลกเจลเลตชนิดมีพิษจำนวนมากหรือเรียกว่าภาวะ การ bloom โดยสัตว์ทะเลพวกกินอาหารโดยการกรอง (filter feeding) เช่น หอยสองฝาบางชนิดจะสะสมไดโนแฟลกเจลเลตที่มีพิษซึ่งถูกกรองเป็นอาหารและสะสมพิษในตัว (Fallon and Shimizu, 1977) มีผลทำให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ในประชาชนที่บริโภคหอย ซึ่งเคยพบในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่น (Kodama and Ogata, 1988) โดยสมมุติฐานนี้สอดคล้องกับรายงานของนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ซึ่งมีรายละเอียดต่างๆ ดังนี้

Buckley และคณะ (1976) ศึกษาการเกิดพิษใน soft shell clam (*Mya arenaria*) ในภาวะ red tide และสามารถแยกไดโนแฟลกเจลเลตสายพันธุ์ *A. tamarense* ที่สร้างพิษกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยได้จากหอยชนิดดังกล่าว

Tamiyavanich และคณะ (1985) ศึกษาถึงการเกิดภาวะอาหารเป็นพิษเนื่องจากการบริโภคหอยแมลงภู่ของประชาชนในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ปี ค.ศ.1983 พบว่าในน้ำทะเลบริเวณที่อยู่ของหอยแมลงภู่มีไดโนแฟลกเจลเลตชนิดที่มีพิษ (*Alexandrium*. sp.)

Boyer และคณะ (1985) ศึกษาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษอัมพาตจากหอยโดยไดโนแฟลกเจลเลต (*A. tamarense*) พบว่าการสร้างพิษของไดโนแฟลกเจลเลตชนิดนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารอาหาร, อุณหภูมิ, ความเข้มของแสงรวมทั้งระยะเวลาในการเจริญ

Ogata และคณะ (1987) ศึกษาการสร้างพิษอัมพาตจากหอยโดย *A. tamarense* พบว่า *A. tamarense* ที่เจริญมาจากเซลล์เดียวกัน แต่เมื่อนำมาเลี้ยงในสภาวะที่ต่างกันจะมีการสร้างสารพิษต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าการสร้างพิษอัมพาตจากหอยโดยไดโนแฟลกเจลเลตไม่ใช่ลักษณะทางพันธุกรรมจึงตั้งสมมุติฐานว่าพิษของไดโนแฟลกเจลเลตอาจมาจากแหล่งภายนอก โดยไดโนแฟลกเจลเลตอาจได้รับมาจากห่วงโซ่อาหารและเกิดการสะสม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kodama (1985) ที่ได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากไดโนแฟลกแจลเลตชนิดที่มีพิษ (*A. tamarense*) และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าแบคทีเรียสามารสร้างพิษอัมพาตจากหอยได้ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่หอยสองฝามีพิษเนื่องมาจากแบคทีเรียสร้างพิษที่อาศัยอยู่ในไดโนแฟลกเจลเลต

Kodama และ Ogata (1988) ได้ตั้งสมมุติฐานว่าการเกิดพิษในไดโนแฟลกเจลเลต *A. tamarense* ไม่ได้เกิดจากการสร้างของไดโนแฟลกเจลเลต แต่เกิดจากแบคทีเรียที่อาศัยภายในเซลล์ของไดโนแฟลกเจลเลต ดังนั้นจึงทำภาคตัดขวาง (section) ของ *A. tamarense* ที่มีพิษและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าภายในเซลล์มีแบคทีเรียสกุล *Moraxella* ที่สร้างพิษอัมพาตจากหอยได้ แต่ภายในเซลล์ของ *A. tamarense* ชนิดไม่มีพิษไม่พบแบคทีเรียสร้างพิษดังกล่าว

Kodama, Ogata, Sakamoto และคณะ (1990) ศึกษาสภาวะในการสร้างสารพิษอัมพาตจากหอยของแบคทีเรีย โดยนำเชื้อ *Moraxella* sp. ที่แยกจาก *A. tamarense* มาเลี้ยงในสภาวะที่ขาดแคลนสารอาหาร พบว่าเชื้อสามารถสร้างพิษอัมพาตจากหอยได้สูงขึ้น และส่วนใหญ่จะเป็นอนุพันธ์ในกลุ่มกอนิออทอกซิน (GTX1 และ GTX4)

สำหรับในประเทศไทย พบแบคทีเรียที่สร้างทั้งอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซินและกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย การศึกษาของ Juntongjin และคณะ (1993) แยกเชื้อแบคทีเรียจากสัตว์ทะเล น้ำทะเลและดินตะกอนในทะเล บริเวณอ่าวไทย ได้เชื้อทั้งหมด 489 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตรวจสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเชื้อ 112 สายพันธุ์

สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ และศิริโฉม (2534) แยกเชื้อ *Vibrio* sp. ที่สร้างสารกีด-ขวางช่องโซเดียมได้จากหอยแมลงภู่ (*Perna viridis* Linn.)

ข. สมบัติของสาร

สารพิษอัมพาตจากหอยเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมที่มีหลายอนุพันธ์แต่อนุพันธ์ที่ใช้เป็นตัวแทนของสารกลุ่มนี้คืออนุพันธ์ซัคซิทอกซิน (saxitoxin, STX) ซึ่งมีชื่อสามัญอื่นๆอีกได้แก่ mussel poison, clam poison, gonyaulax toxin และ paralytic shellfish poison เป็นต้น

สูตรโมเลกุล : $C_{10}H_{17}N_7O_4$

น้ำหนักโมเลกุล : 299.30

ค่าคงที่ของการแตกตัวในน้ำ : มีค่า 8.25 และ 11.60 (Kao, 1986)

การละลาย : ละลายได้ในน้ำและเมทธานอล และละลายบางส่วนในเอทธานอล และกรดอะซิติคเข้มข้น (glacial acetic acid) แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายไขมัน (lipid solvents)

ความเสถียร : เสถียรในสารสะลายกรดแต่ถูกทำลายอย่างรวดเร็วในสารละลายด่าง และเมื่อนำไปต้มในน้ำที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.0 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จะเสียสภาพ

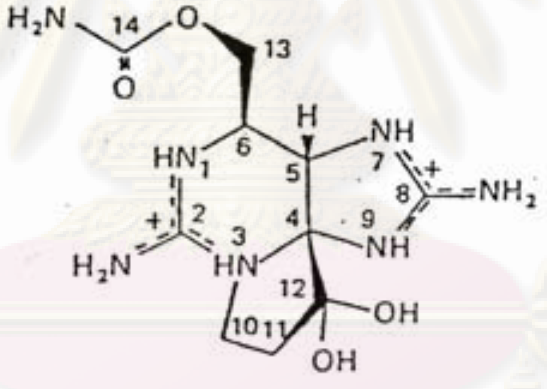
ความเป็นพิษ : ค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าท้องหนูคือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำของหนูคือ 3.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมและค่า LD_{50} เมื่อให้หนูกินคือ 263 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Budavari et al., 1989)

ลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซินจะมีลักษณะเฉพาะที่ไม่พบในสารประกอบธรรมชาติชนิดอื่นๆ ประกอบด้วยหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่ ซึ่งหมู่กัวนิดิเนียมมีหน้าที่เข้าไปจับกับช่องโซเดียม (Kao, 1986) โดยหมู่กัวนิดิเนียมแต่ละหมู่จะเชื่อมกันด้วยพันธะอะเซคีตัล (azaketal linkage) ที่เสถียร (Bower et al., 1981) โครงสร้างทางโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซินแสดงในรูปที่ 4. และสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยประกอบด้วยอนุพันธ์ที่สำคัญ 2 กลุ่ม ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและอนุพันธ์แต่ละกลุ่มยังมีอนุพันธ์ย่อยต่างๆ อีก ได้แก่

อนุพันธ์กลุ่มซัคซิทอกซิน(STXs) ประกอบด้วยอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน(saxitoxin,STX) นีโอซัคซิทอกซิน (neosaxitoxin, NSTX) และดีคาร์บาโมอิลซัคซิทอกซิน (decarbamoylsaxitoxin, DSTX)

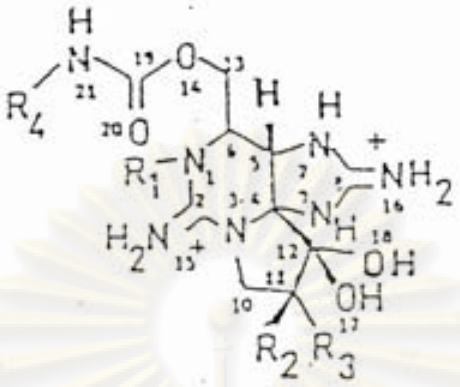
อนุพันธ์กอนิออทอกซิน (GTXs) ประกอบด้วยกอนิออทอกซิน GTX1,GTX2,GTX3, GTX4, GTX5, GTX6, GTX8 หรือ C1 และ epiGTX8 และ C2

ซึ่งแต่ละอนุพันธ์มีระดับความเป็นพิษแตกต่างกันโดย STX มีความเป็นพิษสูงสุด รองลงมาคือ GTX1, NSTX ,GTX4, GTX3, DSTX, GTX2, C2, GTX5, C4, C3 และ C1 ตามลำดับ (Oshima et al.,1987) โดยแต่ละอนุพันธ์มีความแตกต่างกันที่หมู่ข้างเคียง โดยมีจำนวน 4 หมู่ คือ R_1 ถึง R_4 ทำให้มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมได้แตกต่างกัน และเมื่อจัดกลุ่มของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยตามหมู่ข้างเคียงที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยอนุพันธ์แต่ละชนิดของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยดังแสดงในรูปที่ 5.

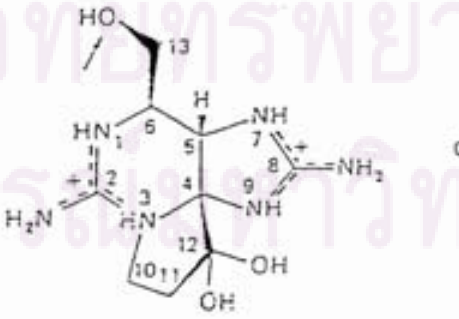


รูปที่ 4. โครงสร้างทางโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน
(Kao and Walker, 1982)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



		R_1	R_2	R_3	R_4
กลุ่ม 1	saxitoxin	H	H	H	H
	neosaxitoxin	OH	H	H	H
กลุ่ม 2	GTX3	H	OSO^{3-}	H	H
	GTX2	H	H	OSO^{3-}	H
	GTX4	OH	OSO^{3-}	H	H
	GTX1	OH	H	OSO^{3-}	H
กลุ่ม 3	GTX5 (B1)	H	H	H	SO^{3-}
	GTX6 (B2)	OH	H	H	SO^{3-}
กลุ่ม 4	epiGTX8 (C1)	H	H	OSO^{3-}	SO^{3-}
	GTX8 (C2)	H	OSO^{3-}	H	SO^{3-}
	C3	OH	H	OSO^{3-}	SO^{3-}
	C4	OH	OSO^{3-}	H	SO^{3-}



decarbamoylsaxitoxin

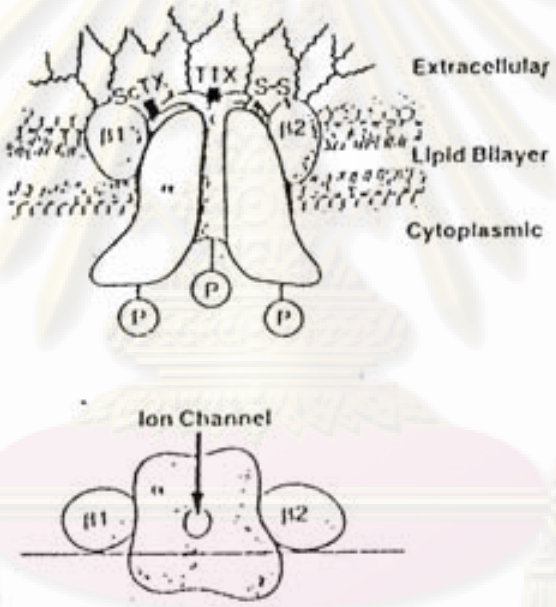
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5. โครงสร้างอนุพันธ์ของพิษอัมพาตจากหอย

(Kodama and Ogata, 1988)

กลไกทางชีวภาพและการนำมาใช้ประโยชน์

สารกีดขวางช่องโซเดียมทั้งสองกลุ่มคือ เทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยจะมีกลไกทางกายภาพที่คล้ายคลึงกันเนื่องจากมีหมู่กัวนิดิเนียมในโมเลกุลเช่นเดียวกัน ซึ่งหมู่กัวนิดิเนียมจะเข้าไปจับทางช่องโซเดียมอย่างจำเพาะตรงบริเวณเยื่อหุ้มแอกซอนของเซลล์ประสาท (Kao, 1986) โดยแสดงภาพจำลองโครงสร้างของช่องโซเดียมเมื่อถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียมในรูปที่ 6.



รูปที่ 6. โครงสร้างของช่องโซเดียมที่ถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียม (Catterall, 1985)

ธารา ตริตระการ และคณะ (2523) ศึกษาผลของเทโทรโดทอกซินต่อสุนัข พบว่าสุนัขที่ได้รับสารเทโทรโดทอกซินปริมาณ 5 ไมโครกรัม โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำจะมีอาการอ่อนแรงยืนไม่ได้ ขาหลังทั้งสองข้างไม่สามารถพยุงตัวได้ เดินไม่ได้และมีอาการแทรกซ้อนคือคลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายอุจจาระและปัสสาวะออกมา ซึ่งอาการเหล่านี้เกิดจากการดูดซึมเทโทรโดทอกซินเข้าทางกระแสโลหิตและมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาชาหรือยาระงับความเจ็บปวด

Kao และ Nishiyama (1965) พบว่าหมู่กัวนิดิเนียมที่เป็นส่วนประกอบของสารกีดขวางช่องโซเดียมมีประจุบวก (cationic charges) ที่แรง จึงเข้าไปจับกับช่องโซเดียมบนเยื่อเซลล์ประสาทที่มีประจุลบ (anionic charges) โดยอาศัยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic attraction) แต่ไม่สามารถผ่านเข้าไปได้เพราะมีขนาดโมเลกุลใหญ่และสร้างพันธะอย่างจำเพาะจับกันระหว่างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมกับเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณติดกับช่องโซเดียมทำให้ไปกีดขวางบริเวณทางผ่านของโซเดียมอิออน

Kao และ Walker (1982) ศึกษาหมู่ของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ทำให้เกิดการกีดขวางช่องโซเดียมอย่างจำเพาะ โดยพบว่าหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่ของซัคซิทอกซินอาจเข้าไปจับกับช่องโซเดียม 1 หมู่ หรือ 2 หมู่โดยหมู่กัวนิดิเนียมที่จับกับช่องโซเดียมคือ บริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7, 8 และ 9 และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxy group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 12 สำหรับเทโทรโดทอกซินส่วนของหมู่กัวนิดิเนียมที่เข้าไปจับกับช่องโซเดียมคือคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4, 8, 9 และ10 ของโมเลกุล แสดงให้เห็นว่าการจับระหว่างโมเลกุลของอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมแต่ละชนิดกับช่องโซเดียมแตกต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมแตกต่างกันไป

สมบัติทางเภสัชวิทยาและทางเคมีของเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยคล้ายคลึงกัน (Kodama ,Noguchi et al., 1983) คือทำให้มีกลไกในการกีดขวางช่องโซเดียมเหมือนกันและจากกลไกในการกีดขวางช่องโซเดียมอย่างจำเพาะของสารกีดขวางช่องโซเดียมทั้งสองอนุพันธ์จึงมีการนำสารกีดขวางช่องโซเดียมมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่นใช้ในการศึกษาด้านประสาทวิทยา (neurophysiology) และประสาทเภสัชวิทยา (neuropharmacology) ซึ่งใช้ในการนับจำนวนช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทและกล้ามเนื้อของสัตว์ชนิดต่างๆโดยการจับของสารกับช่องโซเดียมแบบหนึ่งต่อหนึ่ง และนำมาใช้ในการศึกษาปรากฏการณ์การถูกกระตุ้นของเซลล์ประสาทและเยื่อเซลล์ได้นอกจากนี้ยังอาจประยุกต์นำสารชนิดนี้มาใช้เป็นยาระงับความรู้สึกหรือยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic drug) (Kao and Nishiyama, 1965) ที่มีความจำเพาะสูง ซึ่งเป็นประโยชน์ทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรมอย่างยิ่ง

รายงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

การศึกษาสาเหตุการเกิดพิษในสัตว์ทะเลมีหลักฐานมากมายที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียน่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดพิษในสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยต่างๆ เช่น

Yasumoto และคณะ (1986) เลี้ยงปลาปักเป้าสายพันธุ์ที่มีพิษในสภาพปลอดเชื้อจะไม่พบการสร้างสารพิษ แต่เมื่อนำกลับมาเลี้ยงในสภาพธรรมชาติตามเดิมจะพบสารพิษเกิดขึ้น

Kodama, Ogata, Sato และคณะ (1990) พบว่าแบคทีเรียสร้างพิษ *Moraxella* sp. ที่พบในน้ำทะเลจะมีผลทำให้หอยพัด (scallop) มีความเป็นพิษมากขึ้น ถึงแม้ว่าในบริเวณนั้นจะมีพวกไดโนแฟลกเจลเลตสร้างพิษ (*A. tamarense*) จำนวนน้อย แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียน่าจะเป็นแหล่งของสารพิษชนิดนี้ หรือคาดว่าอาจมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องระหว่างแบคทีเรียกับสัตว์มีพิษ

Kotaki และคณะ (1985) พบว่าเมื่อบ่มเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Vibrio* sp. ในเนื้อเยื่อปูมีพิษ (*Altergatis floridus*) สามารถเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ GTXs ไปเป็นอนุพันธ์ STXs ซึ่งมีความเป็นพิษสูงกว่าได้

สำหรับในประเทศไทย Juntongjin และคณะ (1994) แยกแบคทีเรียสร้างพิษจากหอยทรายและพบว่าระยะที่หอยทรายมีพิษสูงจะพบแบคทีเรียสร้างพิษในตัวหอยและดินตะกอนที่หอยอยู่ในปริมาณสูงกว่าที่พบในหอยทรายพิษต่ำ แต่ไม่ทราบกลไกที่แน่นอนที่ทำให้ระดับความเป็นพิษในหอยทรายแตกต่างกันในสองระยะเวลา ซึ่งได้ตั้งสมมุติฐานว่าเนื่องจากหอยทรายมีการกินอาหารแบบการกรอง (filter feeding) โดยการกรองกินตะกอนจึงได้รับแบคทีเรียสร้างพิษที่อยู่ตามดินตะกอนหรือแพลงก์ตอนเข้าไปสะสมภายในตัวหอยจึงมีผลทำให้หอยทรายมีพิษ แต่พบว่าหอยสองฝาชนิดอื่นๆ เช่น หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจที่อาศัยในบริเวณเดียวกับหอยทราย และมีโอกาสกินอาหารที่มีแบคทีเรียสร้างพิษปนอยู่เช่นเดียวกับหอยทรายไม่มีพิษเกิดขึ้นในตัว จึงเป็นสิ่งที่ต้องหาสาเหตุที่เกิดขึ้น

วิชญา (2536) แยกแบคทีเรียสร้างพิษหลายสายพันธุ์ได้จากหอยทรายและสร้างพิษได้ปริมาณสูง ส่วนในหอยกระปุกซึ่งเป็นหอยไม่มีพิษและอยู่บริเวณเดียวกับหอยทรายพบแบคทีเรียสร้างพิษจำนวนน้อยและสร้างในปริมาณต่ำ

กาญจณา (2536) ศึกษาปัจจัยของน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงและพิษต่ำต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในแบคทีเรียสร้างพิษ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำสกัดจากหอยทรายพิษสูง 50% แบคทีเรียสร้างพิษสามารถสร้างสารพิษได้สูงกว่าการสร้างในอาหารเหลวที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและพบว่าองค์ประกอบของอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซินจะสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวและเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายพิษต่ำ 50%

จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นว่านอกจากแบคทีเรียสร้างพิษที่จัดว่าเป็นแหล่งของสารพิษในสัตว์ทะเลแล้วยังอาจมีปัจจัยบางอย่างที่อาจทำให้พิษจากแบคทีเรียมีผลในการทำให้หอยทรายในช่วงระยะเวลาพิษสูงมีความเป็นพิษสูงขึ้น แต่แบคทีเรียนี้ไม่มีผลกับหอยไม่มีพิษชนิดอื่น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงสาเหตุของการเกิดพิษในสัตว์ทะเล โดยทำการศึกษาในหอยทรายที่เป็นหอยมีพิษ ดังแสดงในรูปที่ 7. หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจที่เป็นหอยไม่มีพิษ ดังแสดงในรูปที่ 8.และ 9. โดยหอยทั้งสามชนิดอยู่ในถิ่นที่อยู่เดียวกันและกินอาหารแบบการกรอง แบคทีเรียสร้างพิษอาจจะเป็นสาเหตุของการเกิดพิษในสัตว์ทะเลและคาดว่าอาจมีปัจจัยบางอย่างระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษกับหอยทรายที่มีผลให้แบคทีเรียสร้างพิษได้สูงกว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยจะเปรียบเทียบกับหอยชนิดอื่นที่ไม่มีพิษคือหอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ เนื่องจากความเป็นพิษในหอยทรายระยะพิษสูงจะมีสารพิษในตัวหอยสูงมาก ถ้าแบคทีเรียเป็นสาเหตุให้หอยมีพิษก็น่าจะมีสารบางชนิดที่ไปชักนำให้แบคทีเรียสร้างพิษได้สูงขึ้น เมื่อหอยสะสมเชื้อนี้ก็จะทำให้หอยมีพิษสูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำสกัดจากหอยทรายและหอยไม่มีพิษที่มีสภาพเหมือนธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการสร้างสารพิษในอาหารเหลวที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานที่คาดว่าอาจมีสารบางอย่างในหอยทรายระยะพิษสูงที่มีผลส่งเสริมให้แบคทีเรียสร้างพิษได้สูงขึ้นและเป็นแนวทางเบื้องต้นในการหาสาเหตุของการเกิดพิษในสัตว์ทะเล กรณีสัตว์เหล่านั้นได้รับแบคทีเรียสร้างพิษซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ตลอดจนเป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันการเกิดสารกีดขวางช่องโซเดียมในสัตว์ทะเลต่อไป

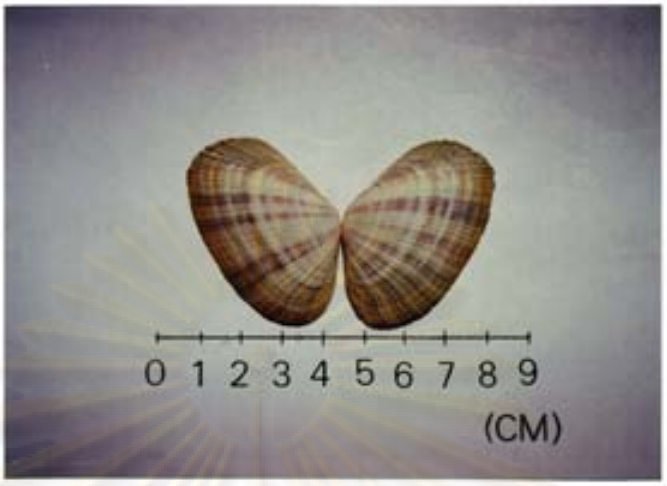
วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษและไม่มีพิษต่อการเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย โดยตรวจสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. เปรียบเทียบอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยโดยวิธีเอชพีแอลซี

3. ศึกษาลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษและไม่มีพิษ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7. หอยทราย (sand clam; *Asaphis violascens*)

รูปที่ 8. หอยกระปุก (ridged venus clam; *Tapes turgidus*)

รูปที่ 9. หอยรูปหัวใจ (Heart shell; *Trachycardium flavum*)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubatorshaker)รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.

2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น D-7200 ของบริษัท GS, W.Germany.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top cemtrifuge) รุ่น Z320 ของบริษัท HERMEL, USA.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifige) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Baush & Lomb, USA.

4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.

5. เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan.

6. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator)

- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (microtube) รุ่น W-385 ของบริษัท Heat System Ultrasonics, USA.

- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ชนิดอ่าง) รุ่น FS4000 ของบริษัท Decon Ultrasonics Ltd., England.

7. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (rotary vaccuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. เครื่องปั่น (homogenizer) รุ่น AM-T ของบริษัท Nihon Seiki Kaisha, Japan.

9. ชุดเครื่องมือสำหรับเตรียมน้ำสกัดจากหอยสองฝา

- ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) รุ่น B-169 ของบริษัท Buchi, Switzerland.

- ชุดกรอง ของบริษัท Sartorius, USA.

- กระดาษกรอง (membrane filter) ชนิด cellulose acetate ที่มีความกว้างของรู ขนาด 8, 5, 3, 1.2, 0.45 และ 0.22 ไมครอน รุ่น GS ของบริษัท Millipore Corporation, USA.

10. ชุดเครื่องมือทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- จานพลาสติกที่มีหลุมขนาดเล็ก 96 หลุม (96-well microtiter plate) ของบริษัท Nunc, Denmark.

- หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกขนาด 15 มล. (plastic centrifuge tube) ของบริษัท Becton Dickinson and Company, USA.

- ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (plastic cell culture flask) ของบริษัท Becton Dickinson and Company, USA.

- ปิเปต (pipet) และปิเปตเอด (pipet aid)

- กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscope) รุ่น C.K ของบริษัท Olympus, Japan.

11. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

- ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) รุ่น A-30-S-2 ของบริษัท Eldex Laboratories, USA.

- คอลัมน์ (column): Senshu Pak ODS-3251-D ขนาด 8.0 x 250 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.

- เครื่องตรวจสอบ (detector)fluoromonitor รุ่น 4100 ของบริษัท LDC Analytical, USA.

- เครื่องบันทึก (recorder) chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.

12. SEP-PAK C_{18} cartridge รุ่น classic ของบริษัท Waters, USA.

13. หัวกรอง ขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน รุ่น HV ของบริษัท Nihon Millipore Tokyo K.K., Japan.

14. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ larminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO, USA.

เคมีภัณฑ์

1. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. โพลีเพปโตน (polypeptone) ของบริษัท Becton Dickinson and CO., USA.
3. กลูโคส (glucose) ของบริษัท E.Merck, Germany.
4. ไฟโตน (phytone) ของบริษัท Becton Dickinson and CO., USA.
5. โพติโอสเพปโตนหมายเลข 3.(proteose peptone No.3) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
6. วิตามิน บี 12 (vitamine B12) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
7. ไบโอติน (biotin) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
8. โฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ (folin phenol reagent) ของบริษัท E.Merck,Germany.
9. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merck, Germany.
11. ทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) อะมิโนมีเทน ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
12. แอนโทรน ($C_{14}H_{10}O$) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
13. อีเทอร์ $(C_2H_5)_2O$ ของบริษัท J.T. Baker, USA.
14. ไธโอยูเรีย $(Cs(NH_2)_2)$ ของบริษัท May & Baker Ltd., England.
15. ทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) ของบริษัท Gibco, USA.
16. เมทธานอล (CH_3OH) ของบริษัท E.Merck, Germany.
17. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E.Merck, Germany.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. อะซิโตไนทริล (CH_3CN) ของบริษัท E.Merck, Germany.

19. กรดเฮปตาฟลูออโรบิวไทริก ($C_4HF_7O_2$) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

20. วอบาย (ouabain) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

21. เวอราทริดีน (veratridine) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

22. สารมาตรฐาน

- เทโทรโดทอกซินของบริษัท Sigma Chemical, USA.

- เทโทรโดทอกซิน ความเข้มข้น 130 mouse unit ต่อมล. ซึ่งได้จาก Department of Domestic Science, Shikoku Women's University, Japan.

23. ฟีตัลโบวีนซีรัม (fetal bovine serum) ของบริษัท Gibco, USA.

24. RPMI 1640 ของบริษัท Gibco, USA.

25. ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน-สเตรปโตมัยซิน (penicillin-streptomycin) ของบริษัท Gibco, USA.

สารเคมีอื่นๆ เป็นสารเคมีในระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆ

จุลินทรีย์

ได้แก่แบคทีเรียต่างๆ ดังนี้

1. *Vibrio alginolyticus* ที่แยกจากหอยทรายบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี (Juntongjin et al., 1993)

2. *Bacillus cereus* ที่แยกจากหอยทรายบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

3. *B. cereus* ที่แยกจากทรายบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

4. *B. megaterium* ที่แยกจากหอยกระปุกบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

5. *Corynebacterium matruchotii* ที่แยกจากทราย บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

6. *V. harveyi* ที่แยกจากน้ำทะเล บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

7. *C. paurometabolum* ที่แยกจากหอยกระปุกบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

8. *C. matruchotii* ที่แยกจากทราย บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

9. *Escherichia coli* TISTR No.780 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR))

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบคทีเรียหมายเลข 2-8 แยกโดยวิชญา เทียนทองดี (2536) ส่วนการจำแนกสกุลและสปีชีส์ของเชื้อหมายเลข 1-8 ทำโดยเบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย (2535), นันทวัน ฤทธิ์เดช (2536) และวรพรรณี พจนสุนทร (2536) และแทนชื่อสายพันธุ์ของเชื้อทั้ง 9 สายพันธุ์ ด้วยอักษร A, B, C, D, E, F, G, H และ I ตามลำดับ

การทดสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียเพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างสารพิษ

นำแบคทีเรียที่แยกจากหอยทราย หอยกระปุก น้ำทะเล ทรายและ *E. coli* จาก TISTR มาทดสอบสมบัติการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยทำการทดลองต่อไปนี้

1. การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวเพื่อนำไปสกัดสารพิษ

เตรียมหัวเชื้อ (inoculum) โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงอยู่บนอาหารแข็ง ORI (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) (Simidu et al., 1983) จำนวน 1 ลูป ปลูกลงในอาหารเหลว L-medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) (Juntongjin et al., 1993) ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28°ซ นาน 24 ชั่วโมง และเลี้ยงแบคทีเรีย (cultivation) โดยนำหัวเชื้อมาวัดค่าความขุ่น (turbidity) ของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและเจือจางหัวเชื้อให้ได้ความขุ่น 0.3 จากนั้นนำหัวเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 50 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวปริมาตร 150 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. นำไปเขย่า โดยใช้ภาวะเดิม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำเชื้อมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และการเจริญ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดโดยวิธี spread dilution plate count บนอาหารแข็ง ORI ส่วนที่เหลือนำไปสกัดสารพิษจากเซลล์

2. การสกัดสารพิษจากเซลล์

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวจากข้อ 1.หน้า 21 มาแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยง

เชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เก็บเฉพาะส่วนเซลล์แบคทีเรีย โดยการล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3M. (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิม เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้งและทำเช่นเดิมซ้ำอีกครั้ง ส่วนตะกอนเซลล์เติมกรดน้ำส้ม 0.1% (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 10-20 มล. จนได้ค่าความเป็นกรดด่าง 3-4 ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) นาน 6 นาที ซึ่งระหว่างทำให้เซลล์แตกต้องควบคุมให้เซลล์อยู่ในอุณหภูมิต่ำ โดยการแช่หลอดที่บรรจุเซลล์ในน้ำแข็งตลอดเวลา และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกกากเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4°ซ เก็บเฉพาะส่วนน้ำใสไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) ส่วนผงที่ได้คือสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งนำไปชั่งน้ำหนักแห้งทั้งหมดและเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

3. การเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

นำสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในข้อ 2. หน้า 21 ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กและละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อ โดยให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มก.ต่อ 10 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำมาตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. การตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture assay) อธิบายตามวิธีของ Kogure และคณะ (1988) ดังนี้

4.1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture)

เลี้ยงเซลล์ประสาทหนู (mouse neuroblastoma cell line, Neuro-2A ATCC CCL 131) ในขวดพลาสติกชนิดคอเอียง สำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (plastic cell culture canted flask) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม โบวีนซีรัม 10% (ภาคผนวก ก หมายเลข 4)

และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ จนมีปริมาณเซลล์มากพอ และสภาพสมบูรณ์ จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดจนแห้ง และเติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.3) ปริมาตร 2 มล. ดูดทิ้งเพื่อล้างเซลล์ไม่ดีออก เติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ ปริมาตร 3 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ใช้มือเคาะข้างขวดหรือเป่าด้วยปิเปตเอดเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่ติดอยู่บนผิวขวดหลุดออกมา เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มล.เขย่าเบาๆ ดูดเซลล์ที่แขวนลอยใส่หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกปราศจากเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดที่มีตะกอนเซลล์ ปริมาตร 5 มล. ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายๆครั้ง เพื่อกระจายเซลล์ ดูดส่วนหนึ่งไปตรวจนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเครื่องนับเซลล์ (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscope) ใช้กำลังขยาย 200 เท่า และเจือจางเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ 1.0-1.5 x 10^5 เซลล์ต่อมล.

4.2 วิธีการตรวจหาเทโทรโดทอกซิน

นำเอาเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมได้ (ความเข้มข้น 1.0-1.5 x 10^5 เซลล์ต่อมล.) ใส่ในหลุมจานพลาสติก (96-well microtiter plate) หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจดูสภาพเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับก่อนนำไปใช้ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมๆละ 40 ไมโครลิตร และเติมสารละลายของสารสกัดภายในเซลล์หลุมละ 10 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงและกวนเบาๆ เติมสารละลายวอบาย (ouabain) เข้มข้น 10 mM (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) หลุมละ 20 ไมโครลิตร และสารละลายเวอราตริดีน (veratridine) เข้มข้น 1 mM (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.2) หลุมละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทำการทดลองสองซ้ำในแต่ละตัวอย่างและทำการทดลองชุดควบคุมควบคู่ไปด้วย โดยใช้สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซินเข้มข้น 130 MU. ต่อมล. ที่ได้จาก Department of Domestic Science, Shikoku Women's University, Japan. โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 0, 0.011, 0.022, 0.044, 0.088, 0.176, 0.352 และ 0.715 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ นำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกมาตรวจนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง Neuro 2A ที่ยังมีชีวิตและนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมดในแต่ละหลุม

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับกำลังขยาย 200 เท่า โดยสังเกตลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตจะมีรูปร่างรี หรือกลม ผิวเซลล์เรียบ และมองเห็นขอบเซลล์ชัดเจน ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีชีวิตจะมีรูปร่างกลมบวม ผิวเซลล์ขรุขระ และมองเห็นขอบเซลล์ไม่ชัดเจน ถึงแม้ว่าจะปรับระยะชัดของกล้อง (ภาคผนวก ค รูปที่ 28.)

คำนวณหาร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิต แล้วนำไปเทียบหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างจากแบคทีเรียแต่ละหมายเลขกับกราฟมาตรฐานของเทโทรโดทอกซินมาตรฐาน (ภาคผนวก ค ข้อ 1) โดยใช้เทโทรโดทอกซินเป็นตัวแทนสารในกลุ่มที่เป็นสารกีดขวาง-ช่องโซเดียม

เมื่อทราบปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยแบ่งกลุ่มออกเป็นแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในปริมาณสูง สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในปริมาณต่ำและไม่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม เพื่อนำแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมาทำการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมน้ำสกัดจากหอยสองฝา

เตรียมน้ำสกัดจากหอยสองฝาเพื่อนำมาใช้เลี้ยงแบคทีเรียที่ได้ตรวจสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม ดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่างหอยสองฝา เพื่อนำมาทำน้ำสกัด

ทำการเก็บหอยสองฝาได้แก่ หอยทราย หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ โดยแบ่งเป็น 2 ระยะ คือระยะหอยทรายมีพิษสูงและระยะหอยทรายมีพิษต่ำ จากบริเวณเกาะสีชัง ด้านที่ติดกับแผ่นดินใหญ่ จังหวัดชลบุรี ระยะหอยทรายมีพิษสูงเก็บในเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2536 โดยเก็บตัวอย่างในเวลาที่น้ำเริ่มลง เก็บเฉพาะหอยทรายที่มีขนาดลำตัวกว้างระหว่าง 3.0-3.5ซม. และยาวระหว่าง 5.0-5.5 ซม. ส่วนหอยกระปุกและหอยรูปหัวใจมีขนาดลำตัวกว้างระหว่าง 2.2-2.5 ซม. และ 5.0-5.5 ซม.ตามลำดับ และยาวระหว่าง 3.0-3.5 ซม. และ 5.5-6.0 ตามลำดับ ส่วนการเก็บตัวอย่างหอยในระยะหอยทรายมีพิษต่ำทำการเก็บบริเวณเดียวกันกับที่เก็บหอยทรายในระยะพิษสูง เดือนสิงหาคม พ.ศ.2536 โดยเก็บหอยที่มีขนาดความกว้างและความยาวใกล้เคียงกับหอยที่

เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง และเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและทรายบริเวณที่เก็บหอยสองฝาใส่ในขวดปราศจากเชื้อมาทำการทดลองด้วย ส่วนหอยจะใส่ในกล่องโฟมและปิดด้วยทรายมาที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทันที ซึ่งจะนำมาทำการทดลองในขณะที่หอยยังไม่ตาย เพื่อป้องกันไม่ให้มีแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่ามาปนเปื้อนตัวอย่าง

2. การตรวจพิษในตัวอย่างเนื้อหอยสองฝาและสิ่งแวดล้อม

2.1 การสกัดสารพิษ

ก. เนื้อหอยสองฝา

- นำหอยสองฝาแต่ละชนิดมาล้างในน้ำทะเลสังเคราะห์ (ภาคผนวก ก ข้อ 3) (Schroder and Van ES, 1980) ปราศจากเชื้อ แกะเปลือกหอยออกด้วยมีดปราศจากเชื้อและนำเนื้อหอยมาล้างด้วยน้ำทะเลสังเคราะห์ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำไปชั่งให้ได้น้ำหนัก 20 กรัม ตัดเนื้อหอยให้ละเอียดด้วยกรรไกร เติม กรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1% ปริมาตร 30 มล. ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (homogenizer) ด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำมาทำให้อนุภาคแตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 12 นาที และปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เก็บชั้นเมทธานอลที่ได้ส่วนตะกอนของเนื้อหอยที่เหลือ นำมาเติมกรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1% ปริมาตร 30 มล. เขย่าด้วยมือนาน 5 นาที เพื่อสกัดสารพิษและนำไปปั่นที่สภาวะเดิม เก็บส่วนเมทธานอล ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง เก็บรวบรวมส่วนเมทธานอลในการสกัดทั้ง 3 ครั้ง ใส่ขวดระเหยรูปกลมและระเหยเมทธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60°ซ เติมกรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1% ลงไปอีก 30 มล.เขย่าและปั่นแยกตะกอนเพื่อเก็บชั้นเมทธานอลและระเหยเมทธานอลออกที่ภาวะเดิมทำการทดลองซ้ำอีก 1 ครั้ง นำส่วนตะกอนมาเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 50 มล. เขย่าด้วยมือนาน 5 นาที เพื่อสกัดไขมันและกรองคลอโรฟอร์มออกด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน นำส่วนตะกอนบนกระดาษกรองมาละลายด้วยกรดน้ำส้ม 0.1% ปริมาตร 15 มล. และผ่านในคอลัมน์สำเร็จรูปเซพแพค ซี 18 (ภาคผนวก ค ข้อ 5) เพื่อให้สารละลายมีความบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน

และนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง ชั่งน้ำหนักผงของสารสกัดที่ได้และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำไปตรวจระดับความเป็นพิษ ซึ่งแสดงแผนผังการสกัดสารพิษในภาคผนวก ค. ข้อ 9.

ข. ทราย

ชั่งทราย 2 ส่วนๆ ละ 200 กรัม ส่วนที่ 1 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. เติมกรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1% ปริมาตร 100 มล.เขย่าด้วยมือนาน 5 นาที เพื่อสกัดสารพิษออกจากทรายและนำไปทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 12 นาที ส่วนที่ 2 ทำการสกัดสารพิษเช่นเดียวกัน แต่ไม่มีการทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เก็บส่วนเมทธานอล สำหรับตะกอนที่เหลือนำมาเติม 0.1%กรดน้ำส้มในเมทธานอลปริมาตร 50 มล. เพื่อสกัดสารพิษและนำไปปั่นที่ภาวะเดิม ทำการสกัดสารพิษซ้ำอีกหนึ่งครั้ง เก็บรวบรวมเมทธานอลทั้ง 3 ครั้ง ใส่ในขวดระเหยรูปกลมและระเหยเมทธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง ส่วนตะกอนที่ได้นำมาละลายในกรดน้ำส้ม 0.1% ปริมาตร 15 มล. และผ่านในคอลัมน์สำเร็จรูปเซพแพค ซี 18 เพื่อให้สารที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน และนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง ชั่งน้ำหนักผงของสารสกัดที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำไปตรวจวัดระดับความเป็นพิษในทราย ซึ่งแสดงแผนผังการสกัดสารพิษในภาคผนวก ค. ข้อ 10. โดยเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษระหว่างทรายที่มีการทำให้อนุภาคแตกกับทรายที่ไม่มีการทำให้อนุภาคแตก

ค. น้ำทะเล

น้ำทะเลปริมาตร 200 มล.แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ขวดละ 25 มล.มาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง และเติมกรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1% เขย่าด้วยมือนาน 5 นาที เพื่อสกัดสารพิษออกจากน้ำทะเล ซึ่งขั้นตอนในการสกัดสารพิษด้วยกรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1%และการทำให้สารพิษบริสุทธิ์บางส่วนทำวิธีการเช่นเดียวกับการสกัดสารพิษจากทราย แสดงแผนผังการสกัดสารพิษในภาคผนวก ค. ข้อ 10.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ ทำการสกัดสารพิษจากน้ำทะเลปริมาตรเดียวกันอีก ส่วนหนึ่ง แต่ไม่มีการทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงเช่นเดียวกับตัวอย่างทรายทั้งนี้ เพื่อเป็นการเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษของวิธีการสกัดสารพิษทั้งสองวิธี

2.2 การตรวจหาระดับความเป็นพิษหรือปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เตรียมสารตัวอย่างที่สกัดได้จากทรายและน้ำทะเลให้อยู่ในรูปสารละลาย โดยละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 1 มก. ต่อ 10 ไมโครลิตร และนำมาตรวจหาระดับความเป็นพิษ โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. วิธีเตรียมน้ำสกัดจากหอยสองฝา

นำตัวอย่างหอยสองฝาแต่ละชนิดมาล้างด้วยน้ำทะเลสังเคราะห์ที่ปราศจากเชื้อ แกะเปลือกหอยออกด้วยมีดปราศจากเชื้อ และล้างด้วยน้ำทะเลสังเคราะห์ปราศากเชื้ออีก 3 ครั้ง ชั่งน้ำหนักเนื้อหอยประมาณ 100 กรัม ใช้กรรไกรปราศจากเชื้อตัดเนื้อหอยให้ละเอียด และเติมน้ำทะเลสังเคราะห์ปริมาตร 1000 มล. นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที จึงนำไปทำให้อนุภาคแตกออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 12 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ทิ้งตะกอน เก็บเฉพาะส่วนน้ำใสมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูขนาด 8, 5, 3 และ 1.2 ไมครอน ตามลำดับ เก็บส่วนที่กรองได้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมานำส่วนน้ำใสที่กรองได้นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายและนำไปปั่นที่ภาวะเดิม แยกส่วนตะกอนทิ้ง ส่วนน้ำใสที่แยกได้นำมากรองซ้ำด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน เก็บส่วนที่กรองได้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 1 คืน ในวันต่อมาทำซ้ำอีกครั้งแต่ใช้กระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน ซึ่งแสดงแผนผังการเตรียมน้ำสกัดในภาคผนวก ค. ข้อ 8.

นำน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดมาตรวจหาความเป็นพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังวิธีการในข้อ 4 หน้า 22 และนำน้ำสกัดจากหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจที่

เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและหอยทรายที่เก็บในระยะพิษต่ำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำสกัดจากหอยสองฝา และแบ่งบางส่วนมาเจือจางด้วยน้ำทะเลสังเคราะห์ให้มีความเข้มข้นของน้ำสกัดจากหอยสองฝาเท่ากับ 75% เพื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียต่อไป

การเปรียบเทียบการเจริญและปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารเหลวกับในน้ำสกัดจากหอยสองฝา

1. การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวและในน้ำสกัดจากหอยสองฝา

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 9 สายพันธุ์ ตามวิธีการคัดเลือกเชื้อ หน้า 21. โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจที่เจือจางเป็น 75% ด้วยน้ำทะเลสังเคราะห์ และนำหัวเชื้อของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาวัดความขุ่นของเซลล์และเจือจางหัวเชื้อให้ได้ความขุ่น 0.3 และถ่ายหัวเชื้อที่เจือจางได้ปริมาตร 50 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ที่มีปริมาตร 200 มล.ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล.ทำการทดลอง 2 ชุด เลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับการเตรียมหัว-เชื้อแต่ใช้เวลา 48 ชั่วโมง

ศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาจำนวน แบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี spread dilution plate count บนอาหารแข็ง ORI และวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การสกัดสารพิษ

2.1 การสกัดสารพิษจากภายในเซลล์แบคทีเรีย

นำเชื้อมาปั่นแยกเอาส่วนเซลล์ออกจากส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำส่วนตะกอนเซลล์มาสกัดสารพิษด้วยกรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1% ตามวิธีการในข้อ 2. หน้า 21 และนำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยกรดน้ำส้ม 0.1% ปริมาตร 15 มล. นำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์เซพแพค ซี 18 ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง และชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำไปวัดปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การสกัดสารพิษในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วปริมาตร 60 มล.มาเติมกรดน้ำส้ม 0.1% จนได้ค่าความเป็นกรดด่าง 3-4 และนำไปต้มในน้ำเดือดนานประมาณ 20 นาที ทำให้เย็นลง จึงนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ทิ้งตะกอนเก็บเฉพาะส่วนน้ำใสมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง และชั่งน้ำหนักผงที่ได้แล้วนำมาเติมกรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1% ปริมาตร 50 มล. เขย่าด้วยมือนาน 5 นาที เพื่อสกัดสารพิษ ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เก็บส่วนเมทธานอลและเติมกรดน้ำส้มในเมทธานอล 0.1% ลงไปอีก 50 มล. เพื่อสกัดสารพิษตามวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง เก็บรวบรวมชั้นเมทธานอลทั้ง 3 ครั้ง มาระเหยเอาเมทธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง ตามวิธีการเช่นเดียวกับการสกัดสารพิษจากเนื้อหอย และชั่งน้ำหนักผงของสารพิษที่สกัดได้ และนำผงของสารสกัดนี้มาละลายด้วยกรดน้ำส้ม 0.1% ปริมาตร 15 มล. เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์เซพแพค ซี 18 และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำไปวัดปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

3. การตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เตรียมสารที่สกัดได้จากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ให้อยู่ในรูปสารละลาย ดังวิธีการในข้อ 3.หน้า 22 และนำมาวัดปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามวิธีการในข้อ 4. หน้า 22 เพื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่อยู่ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์แบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารชนิดต่างๆ โดยคิดเป็นปริมาณสารเทโทรโดทอกซินใน 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาต-จากหอยในเซลล์แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีเอชพีแอลซี

นำสารตัวอย่างที่สกัดได้จากแบคทีเรียในข้อ 2. หน้า 28 รวมทั้งสารที่สกัดได้จากข้อ 2.1 หน้า 25 และข้อ 3. หน้า 27 มาวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกีดขวางช่อง-

โซเดียม ซึ่งระบบในการวิเคราะห์มี 2 ระบบคือระบบสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) และระบบสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs)

1. ระบบการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

การวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซินตามวิธีของ Yasumoto และ Michishita (1985) ระบบของเอชพีแอลซี ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) : รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

คอลัมน์ (column) : Senshu Pak ODS-3251-D, stainless steel ขนาด 8.0 x 250 มม.ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.

ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) : รุ่น A-30-S-2 ของบริษัท Eldex Laboratories,USA.

เครื่องตรวจสอบ (detector) : fluoromonitor รุ่น 4100 ของบริษัท LDC Analytical, USA. ซึ่งตั้งค่า excitation และ emission wavelength 365 และ 510 นาโนเมตร ตามลำดับ

เครื่องบันทึก (recorder) : Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

โมบายเฟส (mobile phase) : อะซีโตไนทริล เข้มข้น 3% ที่มีกรดเฮปตาฟลูออโรบิวไทริก เข้มข้น 0.005 นอร์มัล และกรดอะซีติดเข้มข้น 0.05 นอร์มัล ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 5.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.1.1)และมีอัตราการไหล (flow rate) 0.6 มล.ต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 นอร์มัล (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.1.2.) และมีอัตราการไหล 0.5 มล.ต่อนาที

ฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1-15 ไมโครลิตร โดยใช้เข็มฉีดขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.สารที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์จะทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ในหลอดเทฟลอน (teflon tube) ที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มม. ความยาว 10 เมตร โดยเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100°ซ และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งก่อนเข้าสู่เครื่องตรวจสอบฟลูออเรสเซนซ์ และเครื่องบันทึกผล

2. ระบบการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ประกอบด้วยอนุพันธ์ที่สำคัญ 2 กลุ่มย่อยคือ

- ซัคซิทอกซิน (saxitoxins, STXs)
- กอนิออทอกซิน (gonyautoxins, GTXs)

วิธีการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยตามวิธีของOshima และคณะ (1989) ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์ทำให้โดย Professor Massaki Kodama Laboratory of Marine Biological Chemistry, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Sanriku, Iwate 022-01, Japan. สารทั้งสองกลุ่มย่อยใช้ระบบการวิเคราะห์ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) :รุ่น L-6200 ของบริษัท Hitachi, Japan.

คอลัมน์ (column) : Develosil ODS-5, stainless steel ขนาด 4.6 x 250 มม. ของบริษัท Nomura Chemical, Japan.

ปั๊มแรงดันสูง(high pressure pump) : double head reaction pump รุ่น 655A-13 ของบริษัท Hitachi, Japan.

เครื่องตรวจสอบ (detector)	: fluoromonitor ซึ่งตั้งค่า excitation และ emission wavelength 330 และ 390 นาโนเมตร ตามลำดับ
เครื่องบันทึก (recorder)	: chromato-integrator รุ่น D-2000 ของบริษัท Hitachi, Japan.
โมบายเฟส (mobile phase)	
ก. สำหรับวิเคราะห์ STX, dSTX และneoSTX	:สารละลาย ก ผสมกับอะซีโตไนทริล ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.2.1) และมีอัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที
ข. สำหรับวิเคราะห์ GTX 1, 2, 3, 4 และ 5	: 1-เฮปเทนซัลโฟเนต เข้มข้น 2 mM. ในแอมโมเนียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.2.2) และมีอัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที
ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent)	: กรดเปอร์ไอโอดิก เข้มข้น 7 mM ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 mM ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 9.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.2.3) และมีอัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที
สารละลายปรับความเป็นกรดด่าง (acidifying reagent)	: กรดอะซีติคเข้มข้น 0.5M (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.2.4) และมีอัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

ฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์และเมื่อสารผ่านออกมาจากคอลัมน์จะทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ในหลอดเทฟลอน ที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มม. ยาว 10 เมตร ที่อุณหภูมิ 65°ซ ปรับความเป็นกรดด่างด้วย acidifying reagent ก่อนเข้าเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์และเครื่องบันทึกผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ ในการฉีดวิเคราะห์โดยวิธีเอชพีแอลซีแต่ละครั้งต้องฉีดสารมาตรฐานจนได้ค่า retention time คงที่ก่อนฉีดตัวอย่างสารที่วิเคราะห์ เพื่อเปรียบเทียบค่า retention time ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ และเมื่อฉีดสารตัวอย่างประมาณ 4-5 ตัวอย่าง ต้องฉีดสารมาตรฐานอีก 1 ครั้ง เพื่อเทียบว่า retention time เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ รวมทั้งต้องฉีดสารมาตรฐานครั้งสุดท้ายเมื่อเลิกทำการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกีดขวางช่องโซเดียมในแต่ละกลุ่มที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแต่ละชนิดรวมทั้งอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบในเนื้อหอยสองฝา น้ำสกัดจากหอยสองฝา ทรายและน้ำทะเล

การศึกษาลักษณะทางกายภาพและวิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในน้ำสกัดจากหอยสองฝา

1. ลักษณะทางกายภาพ

สี เปรียบเทียบสีของน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด โดยการสังเกตด้วยตา

ความเป็นกรดด่าง (pH) วัดค่าความเป็นกรดด่างในน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 3.หน้า 27 ด้วยเครื่อง pH meter

ความหนืด (viscosity) วัดความหนืดของน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด ด้วยวิธี viscosity ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่อง Viscometer รุ่น RV-20 rotovis และ RC-20 controller ของบริษัท HAAKE, W. Germany.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำตัวอย่างน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 3. หน้า 27 ปริมาตรประมาณ 10 มล. ใส่ลงในถ้วยชนิด NV และใช้ sensor ชนิด NV ซึ่งการเลือกชนิดของถ้วยและ sensor ขึ้นกับความหนืดของตัวอย่าง จากนั้นตั้งค่า shear rate (D) ที่เครื่องให้หมุนในอัตราตามต้องการ เมื่อเริ่มเดินเครื่องและมีการวัดค่า shear stress (τ) ที่เวลาต่างๆ ซึ่งเครื่องเฉลี่ยและคำนวณค่าความหนืด (viscosity) ออกมา โดยใช้สูตรต่อไปนี้

สูตร ความหนืด (η) (มิลลิปาสคาลต่อวินาที) $= \frac{\text{shear stress } (\tau)}{\text{shear rate (D)}}$

.2 องค์ประกอบทางเคมี

โปรตีน (protein) วิเคราะห์ปริมาณของโปรตีน โดยวิธีลอรี่ (Lowry's method) ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

นำน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 3. หน้า 27 มาเจือจาง 20 เท่า และดูดมา 1.0 มล.ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.3) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.4) ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณโปรตีน

สร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. เป็นโปรตีนมาตรฐาน

ไนโตรเจน (nitrogen) วิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจน โดยวิธีแมคโครเจลดาลห์ (Macro Kjeldahl method) ตามวิธีของ AOAC (1990) ซึ่งทำการวิเคราะห์ โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยโดยใช้เครื่อง Kjeltac (KD-02) รุ่น Kjeltac System 1002 Distilling unit ของบริษัท Tecator,Sweden.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำตัวอย่างน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 3. หน้า 27 ปริมาตร 1มล. เติมไดโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 7.0 กรัมและซีลีเนียม (Se) 0.007 กรัม ซึ่งเป็นคะตะลิสท์และกรดซัลฟุริคเข้มข้นปริมาตร 10 มล. นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40% ปริมาตร 50 มล. นำไปกลั่น และนำขวดที่มีกรดบอริคเข้มข้น 4% ที่เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด มารองรับสารละลายที่กลั่นได้จนได้ปริมาตรประมาณ 150 มล. ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วงแล้วจึงนำไปไตเตรทด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.2166 นอร์มัล จนสารละลายเป็นสีเขียวใสและนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน ซึ่งปริมาณของไนโตรเจนสามารถคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

สูตร

$$\%\text{ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 14.007}{V \times 10}$$

A = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ในการไทเทรตสารตัวอย่าง

B = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ในการไทเทรต blank

C = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ในการไทเทรต (0.2166 N)

V = ปริมาตรของสารตัวอย่าง

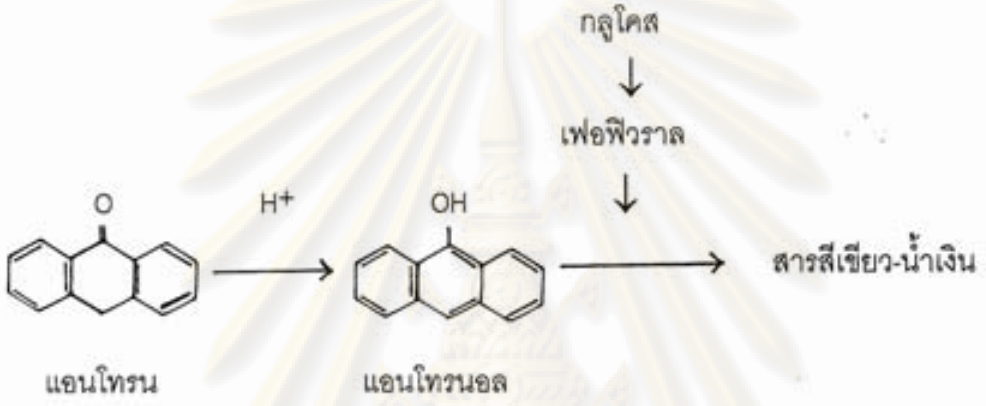
<u>คาร์โบไฮเดรท</u> (carbohydrate) วิเคราะห์ปริมาณของคาร์โบไฮเดรท ด้วยวิธีแอนโทรน (Anthrone's method) ตามวิธีของ Scott และ Melvin (1953)

นำน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 3. หน้า 27 มาเจือจาง 10 เท่า และนำมา 1 มล.ใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง และเติมสารละลายแอนโทรนในกรดซัลฟุริค (anthrone-H_2SO_4) (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ปริมาตร 5 มล. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T144554543

สร้างกราฟมาตรฐานของคาร์โบไฮเดรทโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นตัวแทนของคาร์โบไฮเดรทที่ความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่อมล. ซึ่งในการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรทในน้ำสกัดจากหอยสองฝาจะตรวจหาในรูปของน้ำตาลกลูโคสโดยทำปฏิกิริยากับแอนโทรนในกรดให้สารสีเขียวหรือสีน้ำเงิน ดังแสดงในรูปที่ 10.



รูปที่ 10. ปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสกับแอนโทรนในกรด
(กฤษณา และคณะ, 2521)

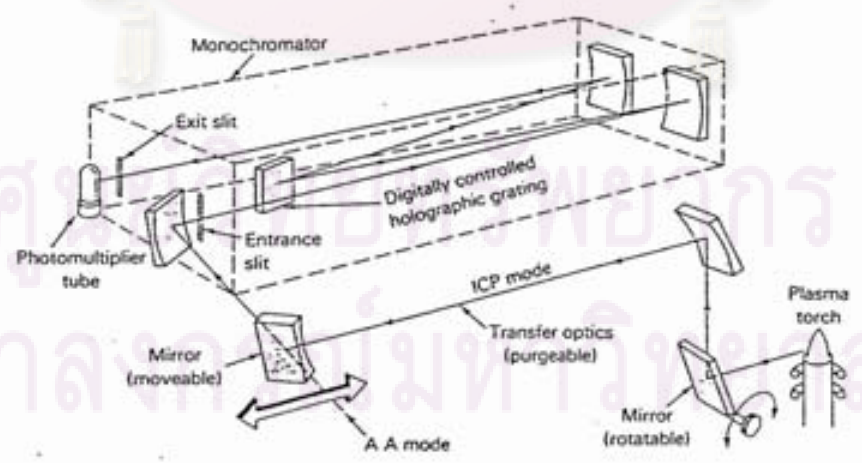
ไขมัน (lipid) วิเคราะห์ปริมาณของไขมัน (lipid) โดยวิธีการสกัดด้วยอีเทอร์ (ether extraction) ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (1990)

นำตัวอย่างน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 3. หน้า 27 ปริมาตร 4 มล. ใส่ในหลอดเกลียวและเติมอีเทอร์ปริมาตร 4 มล. ปิดฝาหลอดไม่แน่นมากและเขย่า โดยคว่ำหลอดขึ้นลงเบาๆ เพราะจะเกิดแรงดัน โดยให้ชั้นอีเทอร์ผสมกับสารตัวอย่างเขย่าประมาณ 5 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดชั้นอีเทอร์ ซึ่งอยู่ส่วนบนออกใส่หลอดแยกเก็บไว้ ส่วนชั้นสารตัวอย่างนำมาเติมอีเทอร์ลงไปอีก 4 มล. ทำซ้ำอีก 3 ครั้ง โดยเก็บชั้นของอีเทอร์รวมไว้ในหลอดเกลียว แล้วจึงนำชั้นอีเทอร์ทั้งหมดมาระเหยออก ซึ่งจะเหลือชั้นของไขมันติดอยู่บริเวณรอบๆ หลอด นำไปชั่งน้ำหนักของไขมันที่ติดอยู่ในหลอด และคำนวณเป็นปริมาณของไขมันต่อปริมาตรของน้ำสกัดจากหอยสองฝา 1 มล.

ฟอสเฟต (phosphate) วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต (PO_4^{3-}) โดยวิเคราะห์หาในรูปของฟอสฟอรัส (P) ด้วยวิธี ICP atomic emission spectrometry ตามวิธีของ McLaren และคณะ (1981) ซึ่งวิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer รุ่น Perkin-Elmer Plasma-100 ของบริษัท Perkin-Elmer, USA.

นำน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดที่เตรียมจากข้อ 3. หน้า 27 มาเจือจาง 10 เท่า แล้วฉีดเข้าเครื่อง ICP ซึ่งส่วนประกอบของเครื่อง ICP ดังแสดงในรูปที่ 11. ส่วนภาวะของเครื่องที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของฟอสฟอรัสเป็นดังนี้ (Winge et al., 1979)

ก. plasma : plasma-therm
HF generator : model HFS-2500D
plasma Ar flow rate : 15 ลิตรต่อนาที
auxiliary plasma Ar : 1 ลิตรต่อนาที
vertical observation zone : 15 มม. เหนือจาก coil
ข. nebulizer : pneumatic cross-flow type
sample uptake rate : 1 มล.ต่อนาที
aerosol carrier Ar flow rate : 1 ลิตรต่อนาที



รูปที่ 11. แผนผังระบบของเครื่อง ICP

(Skoog and Leary, 1994)

ค่าที่คำนวณออกมาจากเครื่อง โดยมีการฉีดสารมาตรฐานฟอสฟอรัสเข้าไปเพื่อเปรียบเทียบค่าแสดงออกมาเป็นปริมาณของฟอสฟอรัส ดังนั้นจึงต้องมีการคำนวณให้อยู่ในรูปของฟอสเฟต ดังสูตรต่อไปนี้

สูตร มก./ลิตรของฟอสเฟต = มก./ลิตรของฟอสฟอรัส x 3.066

(ธงชัย และอุษา, 2535)

กรดอะมิโน (amino acid) วิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิด โดยวิธี acid hydrolysis (Spackman et al., 1958) ด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (amino acid analyser) รุ่น system 6300 ของบริษัท Beckman, USA.ทำการวิเคราะห์ โดยกองชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม

นำน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 3. หน้า 27 มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น (Conc.hydrochloric acid) และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40°ซ ละลายตะกอนที่ได้ในโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (sodium citrate buffer) pH 2.0 และนำมาบรรจุลงใน sample coil วางลงใน auto-injector ของ เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งเครื่องจะทำการวัดปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดและแสดงผลออกมาทางคอมพิวเตอร์ โดยส่วนประกอบและการทำงานของเครื่องแสดงในภาคผนวก ค ข้อ 6.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างสารพิษ โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แบคทีเรียตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 9 สายพันธุ์ ซึ่งแทนด้วยอักษร A-I เชื้อ A-H แยกจากหอยทราย หอยกระปุก ทรายและน้ำทะเล ส่วนเชื้อ I ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) ผลการทดสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2. ข้อ 4 หน้า 22 ซึ่งพบว่าสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียตัวอย่างตามความสามารถในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในปริมาณสูง ได้แก่แบคทีเรีย A, B และ C ซึ่งมีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม 3.12, 2.76 และ2.15 ไมโครกรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตร ตามลำดับ สำหรับกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในปริมาณต่ำ ได้แก่ แบคทีเรีย D, E และ F โดยมีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม 0.17, 0.08 และ0.13 ไมโครกรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตรตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 3 คือกลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม ได้แก่ G, H และ I ดังแสดงในตารางที่ 1.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1. การเจริญและปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (SCB) ที่สร้างจากแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว (L-medium)

แบคทีเรีย	การเจริญ		[3]ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม, µg	
	[1] A_{660}	[2] CFU/มล.		[4]ต่อสารสกัด 1 มก	ต่ออาหาร 1 ลิตร
A	0.610	2.12×10^{13}	60.02	0.0150	3.12
B	0.525	5.26×10^{12}	59.41	0.0145	2.76
C	0.430	3.21×10^{12}	56.64	0.0110	2.15
D	0.515	6.59×10^{12}	31.21	0.0010	0.17
E	0.510	1.43×10^{13}	22.86	0.0005	0.08
F	0.580	6.03×10^{13}	29.05	0.0007	0.13
G	0.470	1.63×10^{13}	13.72	0	0
H	0.551	5.74×10^{12}	12.94	0	0
I	0.616	1.81×10^{13}	15.80	0	0

หมายเหตุ [1] เจือจางเซลล์แบคทีเรีย 5 เท่า ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

[2] จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต (CFU, colony forming unit) บนอาหารแข็ง ORI เมื่อทำวิธี dilution spread plate

[3] ร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิต (%survival cell)

[4] ค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิตกับปริมาณสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน (ในภาคผนวก ค ข้อ 1) เมื่อใช้สารเทโทรโดทอกซินเป็นตัวแทนของสารกีดขวางช่องโซเดียม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการตรวจระดับความเป็นพิษ หรือปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยสองฝา น้ำสกัดจากหอยสองฝาและสิ่งแวดล้อมบริเวณที่เก็บตัวอย่าง โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. เนื้อหอยสองฝาทั้งสามชนิด

จากการตรวจสารตัวอย่างที่สกัดได้จากเนื้อหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง (เดือนพฤษภาคม) และในระยะหอยทรายมีพิษต่ำ (เดือนสิงหาคม) จากข้อ 2.1 (ก) หน้า 25 พบว่าเนื้อหอยทรายในระยะพิษสูงมีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม สูงสุด เท่ากับ 0.1106 ไมโครกรัมต่อเนื้อหอยหนัก 1 กรัม สำหรับเนื้อหอยกระปุกและหอยรูปหัวใจที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงมีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมเท่ากับ 4.51×10^{-3} และ 3.06×10^{-3} ไมโครกรัมต่อเนื้อหอย 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนเนื้อหอยทราย หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจที่เก็บในหอยทรายมีพิษต่ำไม่พบความเป็นพิษ ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 12.

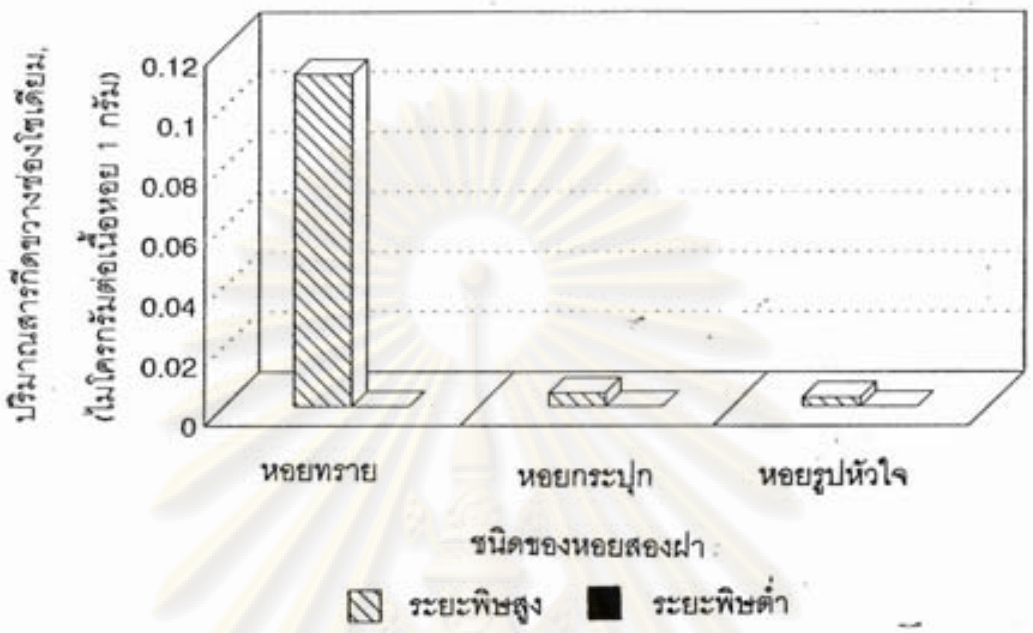
2. สิ่งแวดล้อมบริเวณที่เก็บตัวอย่างหอยสองฝา

เมื่อทำการตรวจทรายและน้ำทะเลที่เก็บจากบริเวณเดียวกันกับที่เก็บตัวอย่างหอยสองฝาทั้งในระยะหอยทรายมีพิษสูงและระยะหอยทรายมีพิษต่ำ พบว่าสารสกัดจากทรายที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง และนำมาทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง มีปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียมสูงสุดเท่ากับ 2.24×10^{-2} ไมโครกรัมต่อทราย 1 กรัม และ 7.03×10^{-2} ไมโครกรัมต่อน้ำทะเล 1 มล. ตามลำดับ ทรายและน้ำทะเลที่เก็บในระยะหอยทรายพิษสูงที่ไม่มีการทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกมีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม 1.29×10^{-3} ไมโครกรัมต่อทราย 1 กรัม และ 3.40×10^{-3} ไมโครกรัมต่อน้ำทะเล 1มล.ตามลำดับ ส่วนทรายและน้ำทะเลที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษต่ำที่มีการทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกมีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม 1.65×10^{-3} ไมโครกรัมต่อทราย 1 กรัม และ 5.42×10^{-3} ไมโครกรัมต่อน้ำทะเล 1 มล. ตามลำดับ สารสกัดจากทรายที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษต่ำและไม่มีการทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกมีปริมาณสารพิษ 5.79×10^{-4} ไมโครกรัมต่อทราย1 กรัม และ 1.13×10^{-3} ไมโครกรัมต่อน้ำทะเล 1 มล. ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 13.

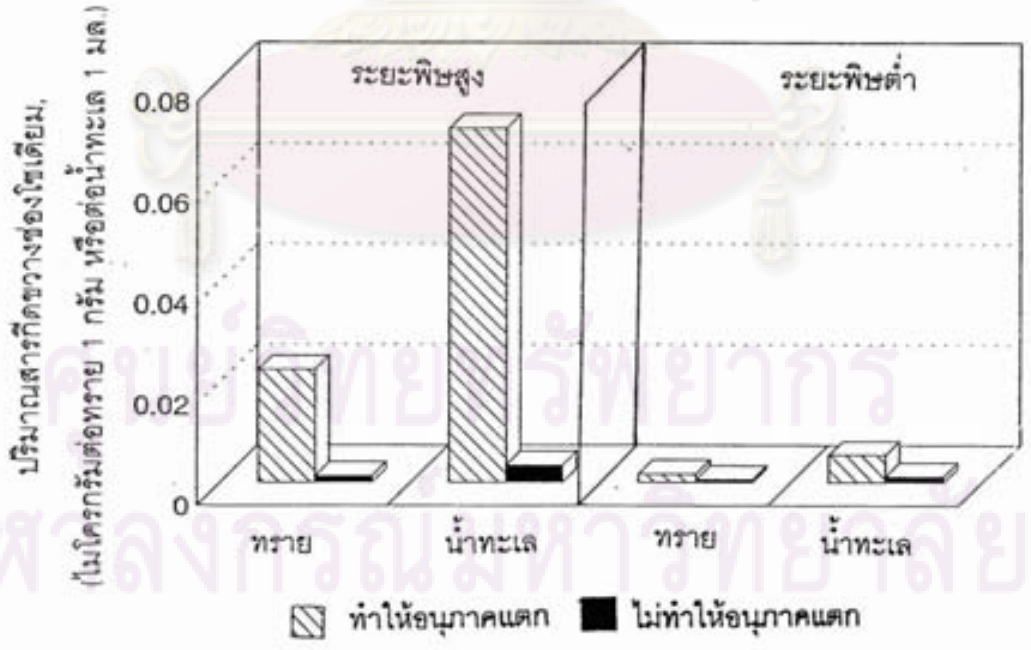
3. น้ำสกัดจากหอยสองฝาทั้งสามชนิด

นำน้ำสกัดที่เตรียมจากเนื้อหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจที่เก็บในระยะที่หอยทรายมีพิษสูง (เดือนพฤษภาคม) และระยะที่หอยทรายมีพิษต่ำ (เดือนสิงหาคม) ที่ได้จากข้อ 3. หน้า 27 มาตรวจวัดปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าน้ำสกัดจากหอยทรายที่เก็บในระยะพิษสูงมีความเป็นพิษเท่ากับ 0.0176 ไมโครกรัมต่อปริมาตรน้ำสกัดจากหอย 1 มล.ส่วนน้ำสกัดจากหอยกระปุกและหอยรูปหัวใจที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษต่ำ รวมทั้งน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษต่ำไม่มีความเป็นพิษ ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 14. และเมื่อนำน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 75%เพื่อนำไปใช้เลี้ยงแบคทีเรียมาตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าน้ำสกัดทุกชนิดที่เจือจางแล้วนั้นไม่มีความเป็นพิษเลย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

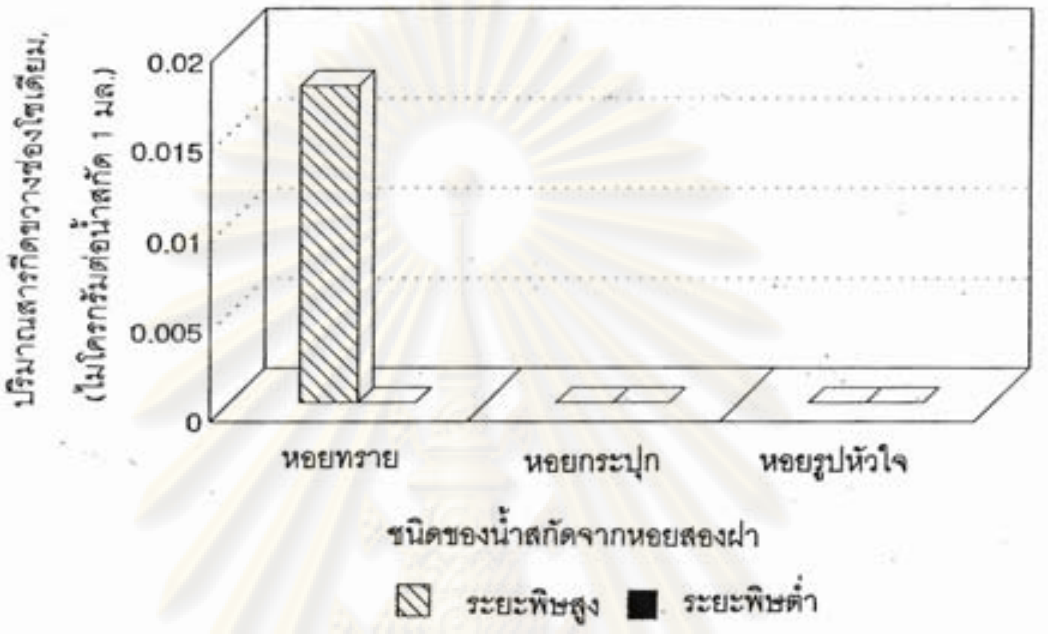


รูปที่ 12. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและหอยทรายมีพิษต่ำ (สกัดโดยใช้เมทธานอล)



รูปที่ 13. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากทรายและน้ำทะเลที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและหอยทรายมีพิษต่ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในน้ำสกัดจากหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและหอยทรายมีพิษต่ำ
(สกัดโดยใช้น้ำทะเลสังเคราะห์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเปรียบเทียบการเจริญและปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ใช้ในห้องปฏิบัติการกับการเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยทราย หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจเจือจาง 75% ที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและหอยทรายในระยะพิษต่ำ

1. การเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ วัดการเจริญด้วยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์และนับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต และวัดค่าความเป็นกรดด่างโดยมีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 7-8 ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 2. และพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเหลวได้ดีที่สุด และมีการเจริญต่ำสุดเมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจ ส่วนการเจริญของแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยทรายที่เก็บในระยะพิษสูง หอยทรายที่เก็บในระยะพิษต่ำ และหอยกระปุกมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน แสดงผลในรูปที่ 15.-17.ตามลำดับ

2. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย

จากการวัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์แบคทีเรียและจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง (A, B, C) ในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงเชื้อจะมีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (คิดรวมทั้งสารสกัดจากภายในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเซลล์) ได้ในปริมาณที่สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ โดยมีค่า 51.94, 22.02 และ41.22 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 18.)

แบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำ (D, E, F) มีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงเช่นเดียวกับแบคทีเรียในกลุ่มสร้างพิษสูงแต่ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ได้ไม่สูงเท่า โดยมีค่า 25.25, 13.68 และ 13.10 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มนี้ในน้ำสกัดจากหอยทรายพิษสูงเชื้อมีการสร้างสาร

พิษภายในเซลล์ได้ต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว แต่มีความเป็นพิษต่อน้ำหนักสาร 1 มิลลิกรัมสูงกว่าเช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง

แบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ (G, H, I) เมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูง สามารถตรวจพบสารกีดขวางช่องโซเดียมภายในเซลล์ปริมาณต่ำ โดยมีค่า 0.04. 0.05 และ 0.05 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร และไม่พบสารพิษนี้ภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ส่วนภายนอกเซลล์พบสารกีดขวางช่องโซเดียมในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดได้ในปริมาณต่ำใกล้เคียงกัน

แสดงผลการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด ในรูปที่ 18-20. โดยคำย่อชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 15-20 แทนด้วยชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

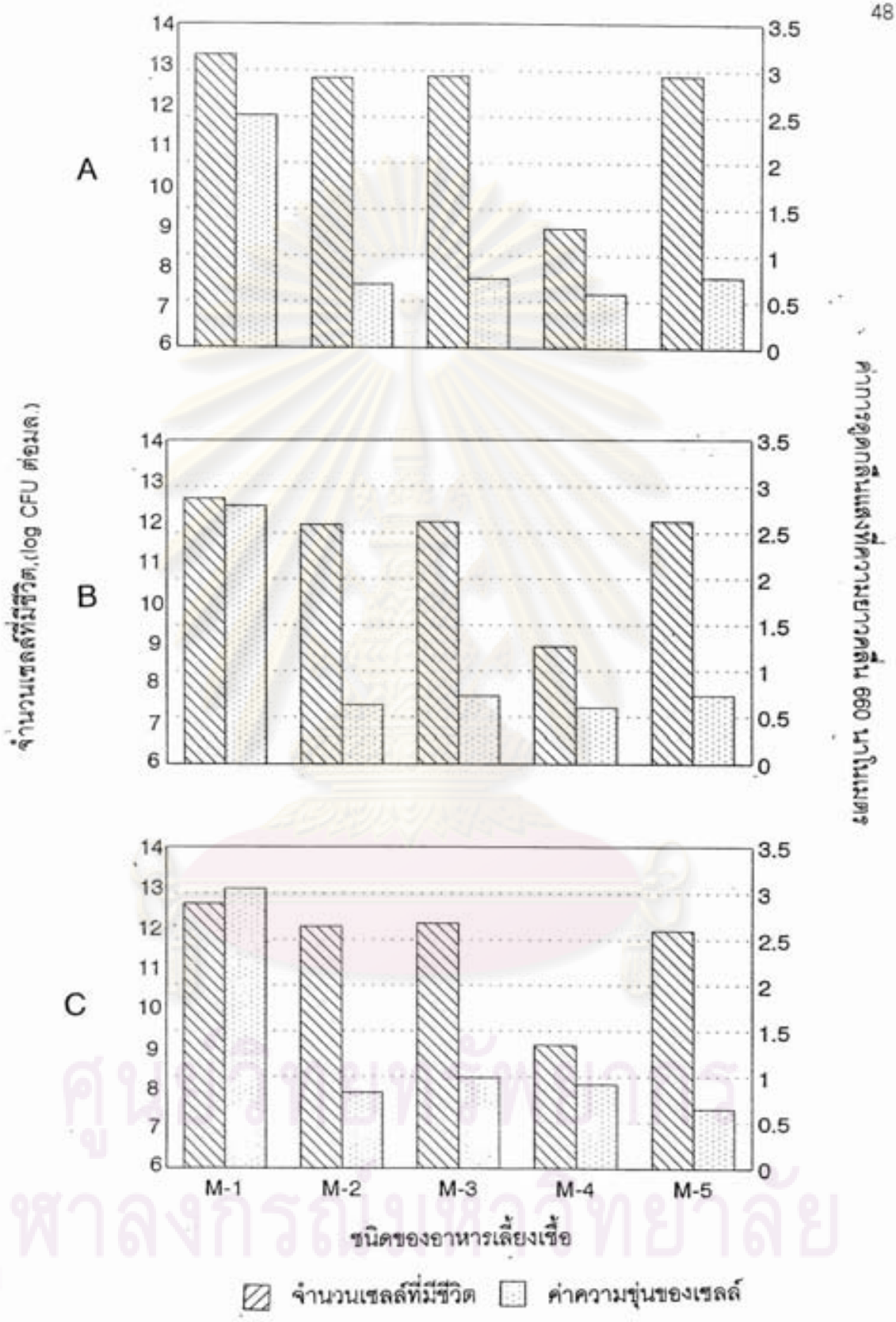
M-1 คืออาหารเหลว
M-2 คือน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูง
M-3 คือน้ำสกัดจากหอยกระปุก
M-4 คือน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจ
M-5 คือน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษต่ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว และน้ำสกัดจากหอยสองฝา

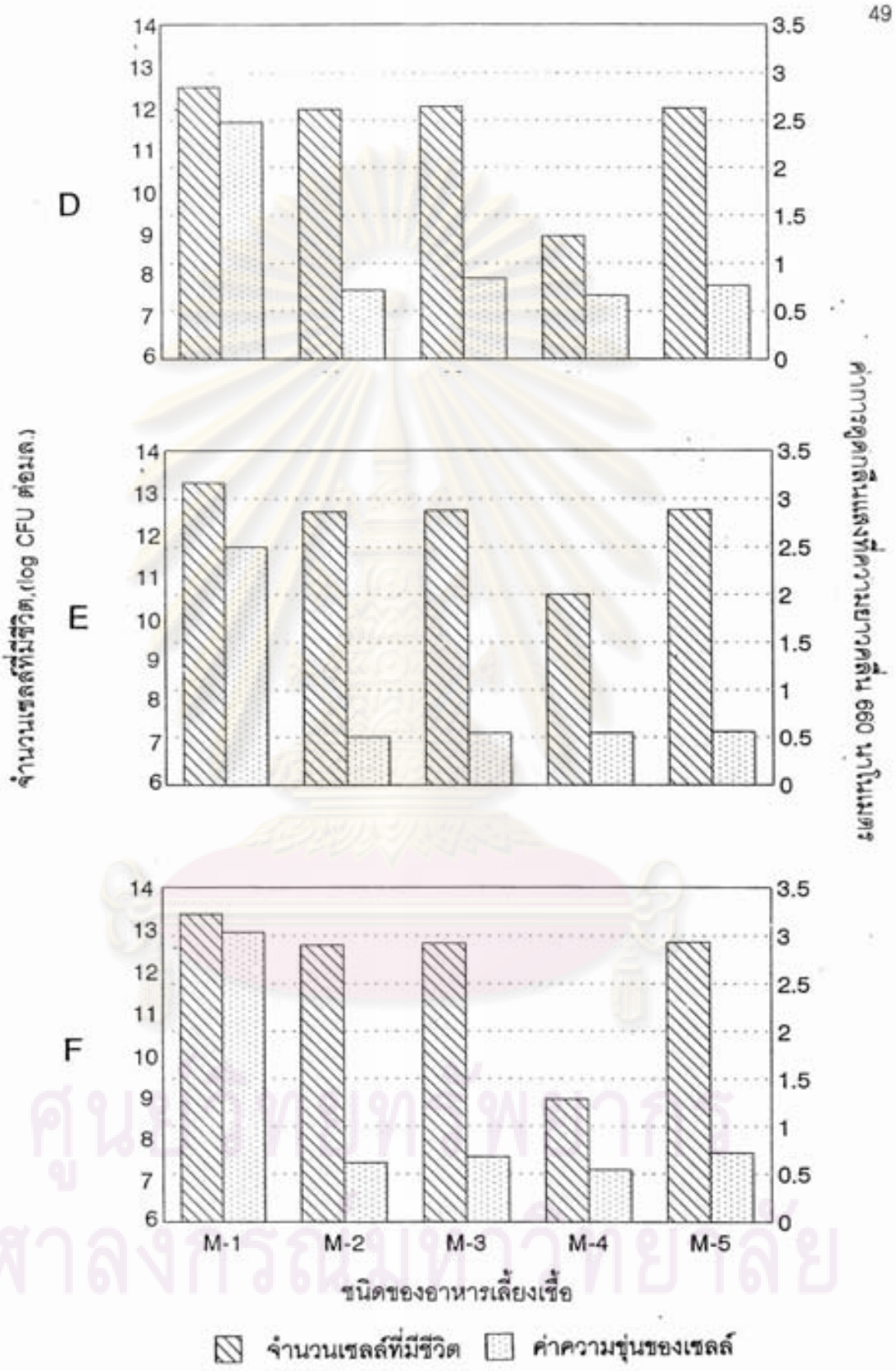
แบคทีเรีย	ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด				
	อาหารเหลว	น้ำสกัดจากหอยมีพิษ		น้ำสกัดจากหอยไม่มีพิษ	
		หอยทราย, พิษสูง	หอยทราย, พิษต่ำ	หอยกระปุก	หอยรูปหัวใจ
สร้างพิษสูง					
A	7.90	7.47	7.63	7.60	7.47
B	7.44	7.37	7.41	7.64	7.28
C	7.36	7.34	7.43	7.63	7.27
สร้างพิษต่ำ					
D	7.84	7.43	7.39	7.49	7.11
E	7.89	7.44	7.45	7.61	6.84
F	7.94	7.11	7.47	7.68	7.42
ไม่สร้างพิษ					
G	8.06	7.06	7.31	7.53	7.28
H	8.03	7.02	7.69	7.70	7.30
I	7.33	7.13	7.53	7.57	7.22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

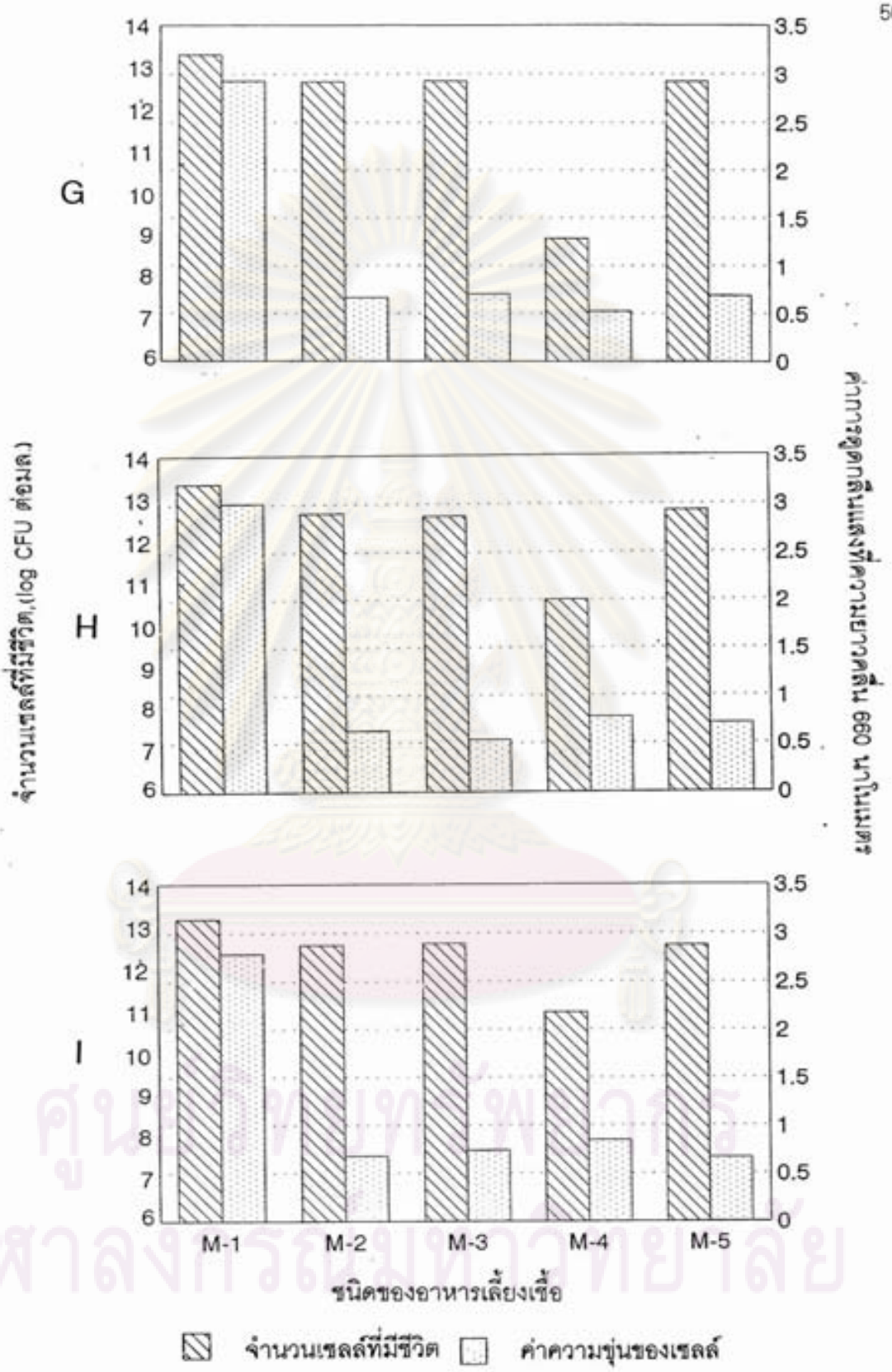


รูปที่ 15. การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง (A, B, C) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

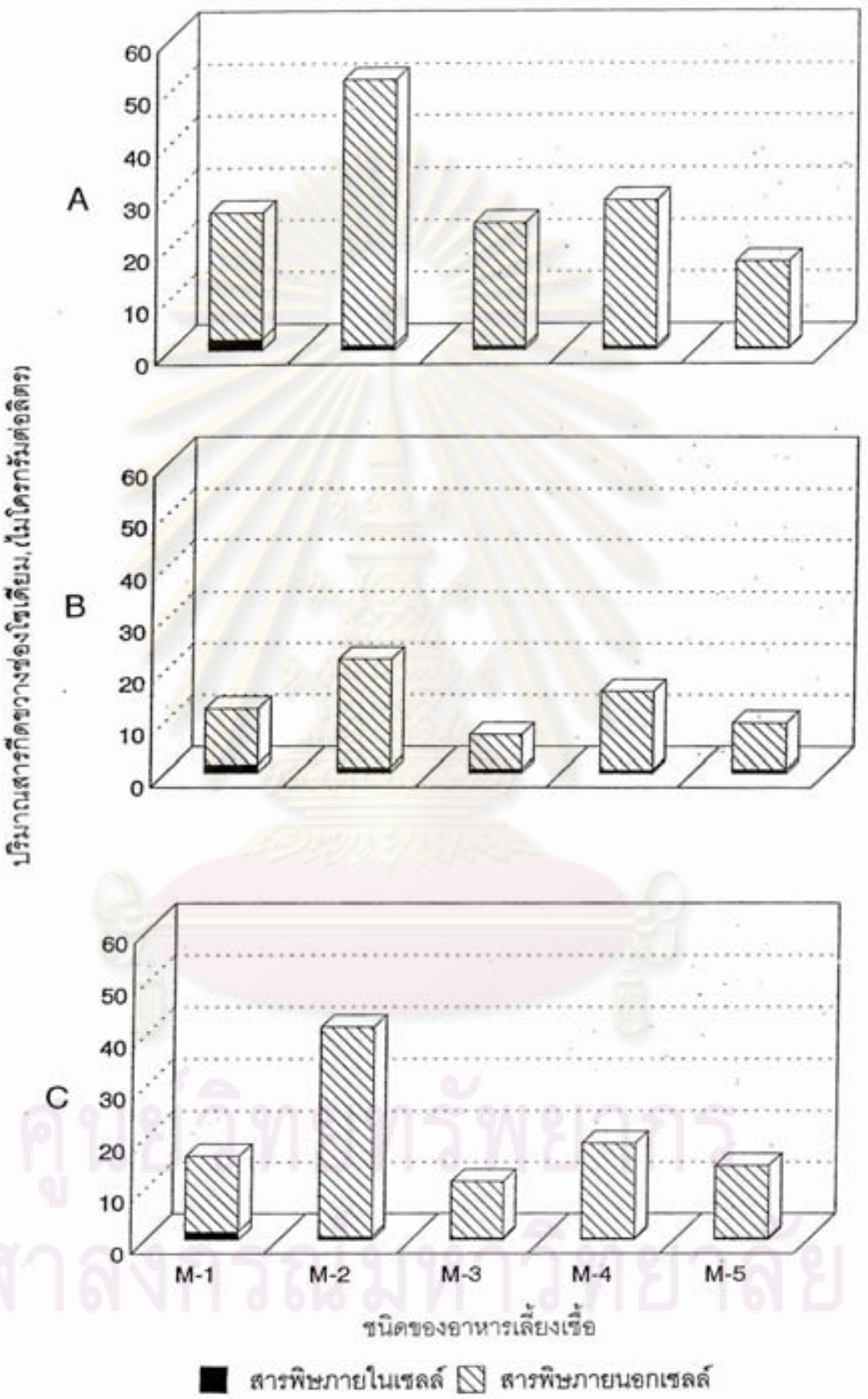


รูปที่ 16. การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำ (D, E, F) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา



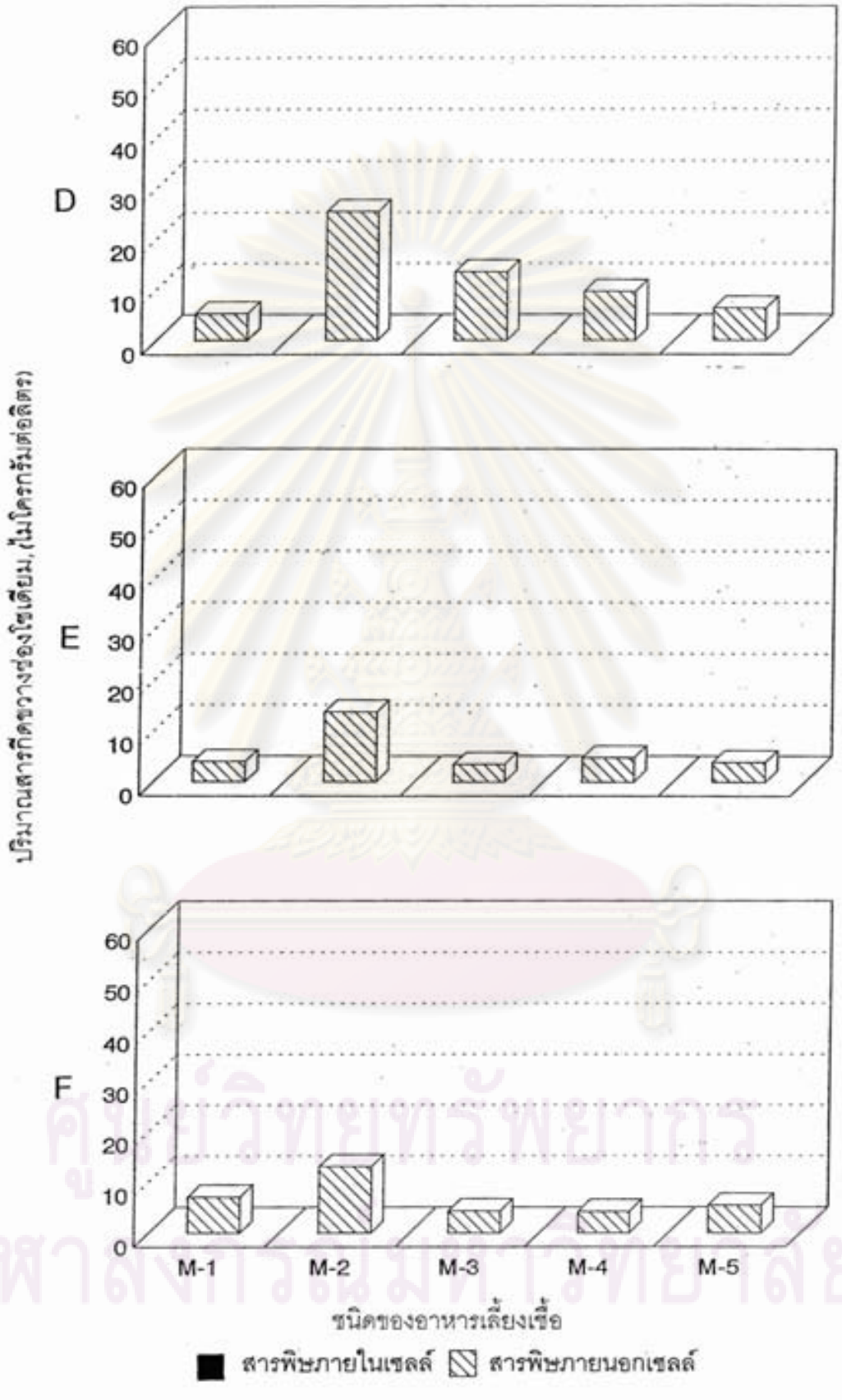
รูปที่ 17. การเจริญแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ (G, H, I) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



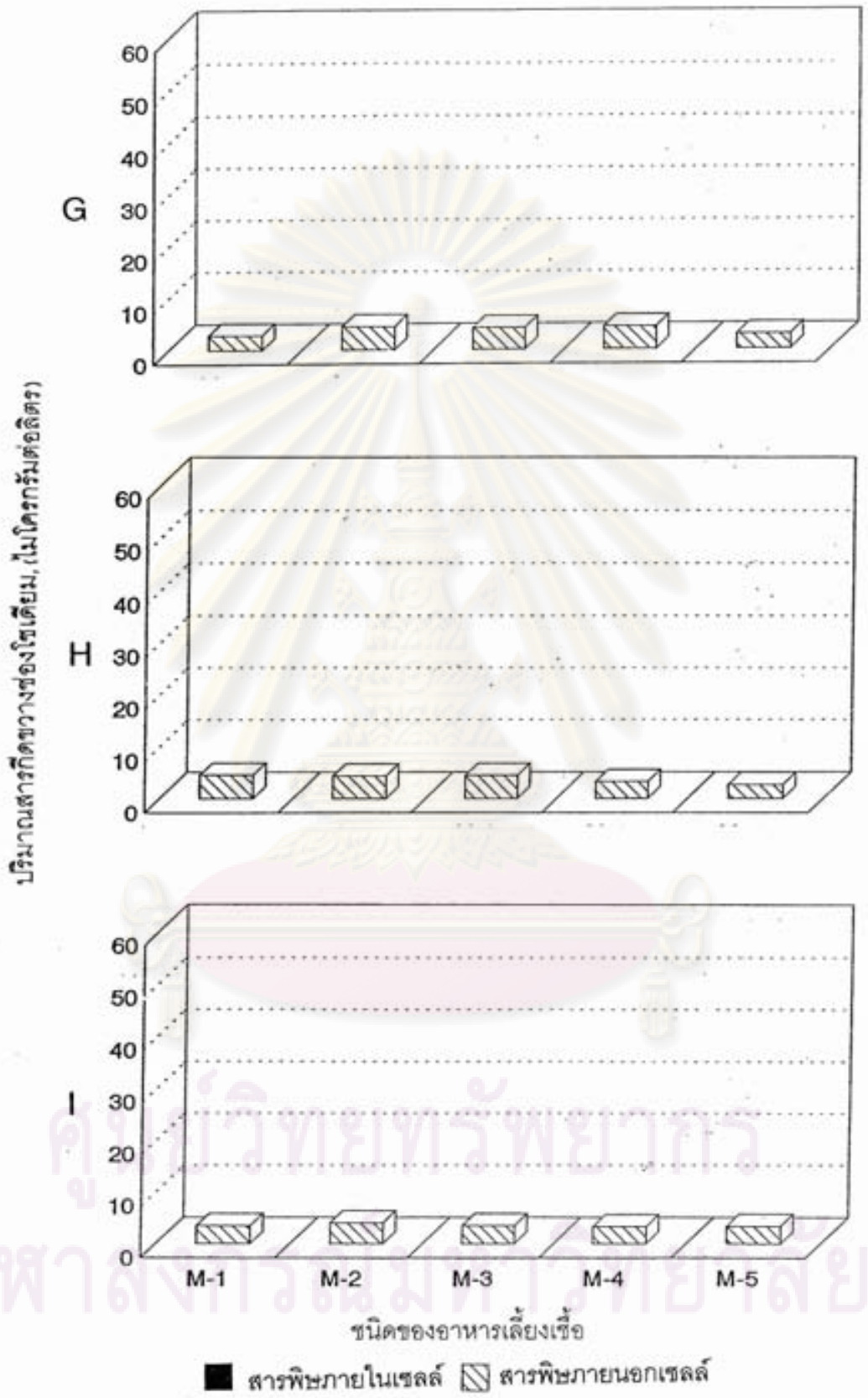
รูปที่ 18. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธุ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยจากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝาทั้งสามชนิด รวมทั้งสารจากเนื้อหอยสองฝาที่สกัดโดยใช้เมทธานอล น้ำสกัดจากหอยสองฝา ทรายและน้ำทะเล โดยวิธีเอชพี-แอลซี (HPLC)

1. ผลการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

การวิเคราะห์สารจากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียจากบทที่ 2 ข้อ 2 หน้า 28 รวมทั้งสารสกัดจากเนื้อหอยสองฝา น้ำสกัดจากหอยสองฝา ทรายและน้ำทะเล จากข้อ 2.1 หน้า 25 และข้อ 3. หน้า 27 โดยหาอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซิน ได้แก่เทโทรโดทอกซิน (TTX) และแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน (anh-TTX) ซึ่งพบว่าสารจากภายในเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง และกลุ่มสร้างพิษต่ำบางสายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงสามารถตรวจพบอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินได้ แต่ไม่พบอนุพันธ์แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน ส่วนแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษไม่พบอนุพันธ์ทั้งสองชนิด สำหรับสารสกัดจากภายนอกเซลล์แบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง และสร้างพิษต่ำบางสายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงสามารถตรวจพบทั้งอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นอีก 4 ชนิด ส่วนใหญ่พบแต่อนุพันธ์แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน และแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษไม่พบอนุพันธ์ทั้งสองชนิด ส่วนเนื้อหอยทรายและน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงสามารถตรวจพบอนุพันธ์ทั้งสองชนิด เนื้อหอยทรายในระยะพิษต่ำ หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ รวมทั้งน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษต่ำ หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจไม่พบอนุพันธ์ชนิดใด นอกจากนี้ได้ตรวจพบอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินในสารสกัดจากทรายและน้ำทะเลที่เก็บในระยะที่หอยทรายมีพิษสูง ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 3-6. และโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มเทโทรโดทอกซิน และสารสกัดบางตัวอย่างแสดงในรูปที่ 21.

<u>หมายเหตุ</u> สารสกัดจากทรายและน้ำทะเลที่ตรวจหาอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซินจะตรวจหาเฉพาะตัวอย่างที่มีวิธีการสกัด โดยมีการทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกออกเท่านั้น

ตารางที่ 3. ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

แบคทีเรีย	ชนิดของอนุพันธ์ TTXs ที่พบภายในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิด									
	อาหารเหลว		น้ำสกัดจากหอยมีพิษ				น้ำสกัดจากหอยไม่มีพิษ			
			หอยทราย,พิษสูง		หอยทราย,พิษต่ำ		หอยกระปุก		หอยรูปหัวใจ	
	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTx	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTX
สร้างพิษสูง										
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
สร้างพิษต่ำ										
D	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
E	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ไม่สร้างพิษ										
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

แบคทีเรีย	ชนิดของอนุพันธ์ TTXs ที่พบภายนอกเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิด									
	อาหารเหลว		น้ำสกัดจากหอยมีพิษ				น้ำสกัดจากหอยไม่มีพิษ			
			หอยทราย,พิษสูง		หอยทราย,พิษต่ำ		หอยกระปุก		หอยรูปหัวใจ	
	TTX	anh-TTX	TTX	TTX	anh-TTX	TTX	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTX
สร้างพิษสูง										
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
สร้างพิษต่ำ										
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
ไม่สร้างพิษ										
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

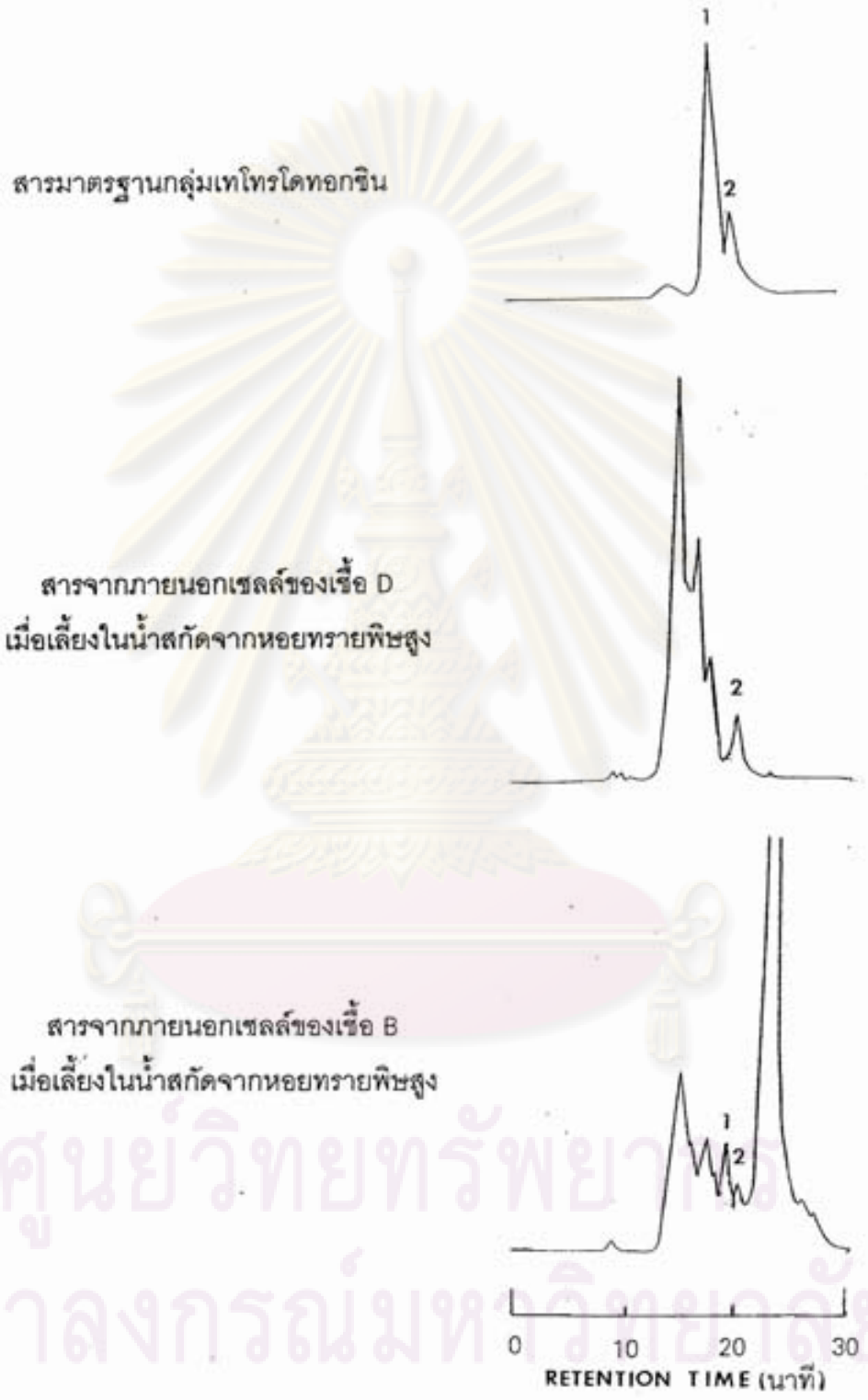
ตารางที่ 5. ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบในสารสกัดจากเนื้อหอยสองฝา โดยเมทธานอลและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

ชนิดของหอยสองฝา	ชนิดของอนุพันธ์ TTXs ที่พบในเนื้อหอยสองฝา		ชนิดของอนุพันธ์ TTXs ที่พบในน้ำสกัดจากหอยสองฝา	
	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTX
หอยทราย, พิษสูง	+	+	+	+
หอยกระปุก	-	-	-	-
หอยรูปหัวใจ	-	-	-	-
หอยทราย, พิษต่ำ	-	-	-	-

ตารางที่ 6. ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบในทรายและน้ำทะเล

ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของอนุพันธ์ TTXs ที่พบในทราย		ชนิดของอนุพันธ์ TTXs ที่พบในน้ำทะเล	
	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTX
ระยะที่หอยทรายมีพิษสูง (เดือนพฤษภาคม)	+	-	+	-
ระยะที่หอยทรายมีพิษต่ำ (เดือนสิงหาคม)	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21. โครมาโตแกรมของสารมาตราฐานกลุ่มเทโทรโดทอกซินและสารตัวอย่าง

1 = TTX; 2 = anh-TTX

2. ผลการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

การวิเคราะห์สารจากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียจากบทที่ 2 ข้อ 2 หน้า 28 รวมทั้งสารสกัดจากเนื้อหอยสองฝา น้ำสกัดจากหอยสองฝา ทรายและน้ำทะเล จากข้อ 2.1 หน้า 25 และข้อ 3. หน้า 27 โดยอนุพันธ์กลุ่มของพิษอัมพาตจากหอยที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ กลุ่มซัคซิทอกซิน (STXs) ซึ่งประกอบด้วย อนุพันธ์ซัคซิทอกซิน (STX), นีโอซัคซิทอกซิน (NSTX), ดีคาร์บาโมอิลซัคซิทอกซิน (DSTX) และกลุ่มกอนิออทอกซิน (GTXs) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์กอนิออทอกซิน 1, 2, 3, 4 และ 5 (GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 and GTX5) และกลุ่มซี (C) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ซี 1, 2, 3 และ 4 (C1, C2, C3 และ C4) พบว่าตรวจพบอนุพันธ์ STX, NSTX, DSTX, GTX4, C1 และ C4 ในปริมาณสูงในสารจากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงและกลุ่มสร้างพิษต่ำ เมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูง โดยเฉพาะอนุพันธ์ STX และ NSTX พบในสารจากภายนอกเซลล์ปริมาณสูงมาก โดยพบ STX และ NSTX 20.028, 15.569 และ 16.449 นาโนโมลต่อมล. ในแบคทีเรียสายพันธุ์ A, D และ G ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล) แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นจะตรวจพบอนุพันธ์เพียงบางชนิดและพบในปริมาณต่ำ ส่วนแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษเมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงพบอนุพันธ์บางชนิด เช่น STX, DSTX, NSTX และGTX4 แต่พบในปริมาณต่ำและพบเพียงหนึ่งหรือสองอนุพันธ์ต่อหนึ่งตัวอย่าง ผลการตรวจอนุพันธ์กลุ่มต่างๆ ของพิษอัมพาตจากหอยแสดงในตารางที่ 7-11.

ผลการตรวจหาอนุพันธ์กลุ่มสารพิษอัมพาตจากหอยในน้ำสกัดจากหอยทรายทั้งสองระยะ พบว่าในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงมีอนุพันธ์ C3 เพียงอนุพันธ์เดียวและมีปริมาณต่ำ ส่วนในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำไม่พบอนุพันธ์ชนิดใดเลย และพบอนุพันธ์ GTX1 และ GTX4 ในน้ำทะเลที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง ส่วนทรายที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงและพิษต่ำรวมทั้งน้ำทะเลในระยะพิษต่ำไม่พบอนุพันธ์ชนิดใดเลย (ตารางที่ 12-13.) โครมาโตแกรมของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยแต่ละกลุ่ม ได้แก่ อนุพันธุ์กลุ่ม STXs, GTXs และ C จากบางตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แสดงในรูปที่ 22-24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ ตัวอย่างที่นำมาทำการวิเคราะห์หาชนิดของอนุพันธ์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยแต่ละชนิดทำการคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มการทดลองโดยเฉพาะโดยเฉพาะที่พบว่ามีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม สำหรับตัวอย่างที่สกัดจากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียได้นำมาจากเชื้อ A, D, และ G มาทำการวิเคราะห์

ตารางที่ 7. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว

แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	นอก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
พิษต่ำ	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	นอก	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

ตารางที่ 8. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูง

แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A	นอก	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
พิษต่ำ	ใน	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D	นอก	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ไม่มีพิษ	ใน	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	นอก	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

ตารางที่ 9. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำ

แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A	นอก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
พิษต่ำ	ใน	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
D	นอก	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 10. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยกระปุก

แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	นอก	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
พิษต่ำ	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
D	นอก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจ

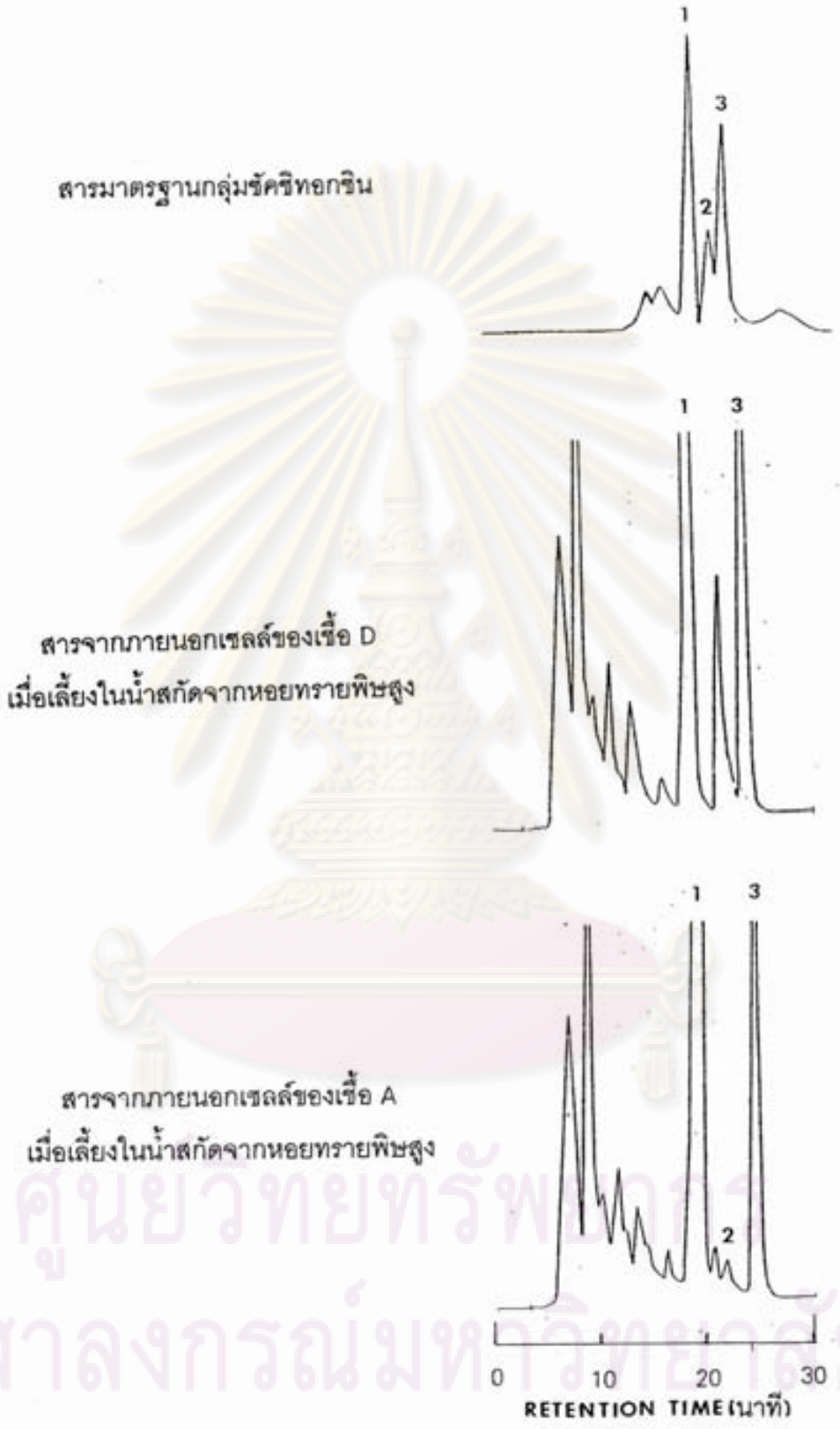
แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A	นอก	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
พิษต่ำ	ใน	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
D	นอก	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

ตารางที่ 12. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบในน้ำสกัดจากหอยทรายทั้งสองระยะ

ระยะเวลา	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบในน้ำสกัดจากหอยทราย											
เป็นพิษ	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
พิษต่ำ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 13. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบในทรายและน้ำทะเล

ระยะ	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบในทรายและน้ำทะเล											
เวลา	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ทราย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(พ.ค)	น้ำทะเล	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
พิษต่ำ	ทราย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(ส.ค)	น้ำทะเล	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



รูปที่ 22. โครมาโตแกรมของสารมาตราฐานกลุ่มซัคซิทอกซินและสารตัวอย่าง

1 = NSTX; 2 = DSTX; 3 = STX

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 23.</u> โครมาโตแกรมของสารมาตราฐานกลุ่มกอนิออทอกซินและสารตัวอย่าง

1 = GTX4; 2 = GTX1; 3 = GTX5; 4 = GTX3; 5 = GTX2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24. โครมาโตแกรมของสารมาตราฐานกลุ่มซีและสารตัวอย่าง

1 = C1; 2 = C2; 3 = C3; 4 = C4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูง หอยทรายระยะพิษต่ำ หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ

1. ลักษณะทางกายภาพ

สี เปรียบเทียบสีของน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด พบว่าน้ำสกัดจากหอยทรายทั้งสองระยะและหอยรูปหัวใจมีสีน้ำตาลอ่อนคล้ายคลึงกัน ส่วนน้ำสกัดจากหอยกระปุกมีสีเหลืองใส ซึ่งอ่อนกว่าน้ำสกัดจากหอยทรายและหอยรูปหัวใจ แสดงผลในตารางที่ 14.

ความเป็นกรดด่าง ความเป็นกรดด่างในน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันโดยอยู่ในช่วง 6.9-7.0 ดังแสดงผลในตารางที่ 14.

ความหนืด นำน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด ไปวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง viscometer พบว่าน้ำสกัดจากหอยกระปุกมีความหนืดสูงสุดเท่ากับ 0.4303 มิลลิปาสคาลต่อ วินาที ส่วนน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงมีความหนืดต่ำสุดเท่ากับ 0.3195 มิลลิปาสคาลต่อวินาที น้ำสกัดจากหอยทรายระยะไม่มีพิษและหอยรูปหัวใจมีความหนืดใกล้เคียงกัน คือ 0.3649 และ 0.3682 มิลลิปาสคาลต่อวินาที ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 14.

2. องค์ประกอบทางเคมี

โปรตีน ปริมาณโปรตีนในน้ำสกัดจากหอยตรวจโดยวิธีลอรี่ ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 ข้อ 2 หน้า 34 ซึ่งนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (ภาคผนวก ค ข้อ 2.) พบว่าในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจมีปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 0.112 กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล. ส่วนน้ำสกัดจากหอยทรายทั้งระยะพิษสูงและพิษต่ำและหอยกระปุกมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.109, 0.108 และ 0.106 กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล. ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 15.

ไนโตรเจน วัดปริมาณไนโตรเจนในน้ำสกัดโดยวิธีแมคโครเจลดาลห์ (Macro kjeldahl) ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 ข้อ 2 หน้า 34 พบว่าน้ำสกัดทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณของไนโตรเจนใกล้เคียงกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.08-0.10 กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล. ดังแสดงผลในตารางที่ 15.

คาร์โบไฮเดรท วัดปริมาณคาร์โบไฮเดรทในน้ำสกัดจากหอย โดยวิธีแอนโทรน ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 ข้อ 2 หน้า 35 ซึ่งนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (ภาคผนวก ค ข้อ 3) พบว่าน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษต่ำมีปริมาณคาร์โบไฮเดรทสูงสุดเท่ากับ 9.92×10^{-3} กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล. ส่วนในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจมีปริมาณคาร์โบไฮเดรทต่ำสุดเท่ากับ 7.92×10^{-3} กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล. ดังแสดงผลในตารางที่ 15.

ไขมัน วัดปริมาณไขมันในน้ำสกัดจากหอย โดยการสกัดไขมันด้วยอีเทอร์ (ether extraction) ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 ข้อ 2 หน้า 36 พบว่าน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำมีปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 0.458 กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล. ส่วนในน้ำสกัดจากหอยกระปุกมีปริมาณไขมันต่ำสุดเท่ากับ 0.168 กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล. ดังแสดงผลในตารางที่ 15.

ฟอสเฟต วัดปริมาณฟอสเฟตในน้ำสกัด โดยวิธี ICP atomic emission spectrometry ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 ข้อ 2 หน้า 37 พบว่าในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจมีปริมาณฟอสเฟตสูงสุดเท่ากับ 1.61×10^{-2} กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล. ส่วนน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงมีปริมาณฟอสเฟตต่ำสุด คือ 8.40×10^{-3} กรัมต่อปริมาตรน้ำสกัด 100 มล.แสดงผลในตารางที่ 15.

กรดอะมิโน วัดปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในน้ำสกัดโดยใช้วิธี acid hydrolysis ด้วยเครื่อง amino acid analyser ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 ข้อ 2 หน้า 38 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิด พบว่าปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่พบในน้ำสกัดจาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทรายระยะพิษสูง ส่วนใหญ่มีปริมาณต่ำกว่าในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำ หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจเช่น กรดแอสพาติค เซอรีน กรดกลูตามิค ไกลซีน อลานีน และอาร์จินีน เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 16.

ตารางที่ 14. สี, ค่าความเป็นกรดด่างและความหนืดของน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด

ชนิดของน้ำสกัด	สี	pH	ความหนืด (η) (มิลลิปาสคาลต่อวินาที)
หอยทรายระยะพิษสูง	น้ำตาลอ่อน	7.00	0.3195
หอยทรายระยะพิษต่ำ	น้ำตาลอ่อน	7.06	0.3649
หอยกระปุก	เหลืองใส	7.03	0.4303
หอยรูปหัวใจ	น้ำตาลอ่อน	6.90	0.3682

ตารางที่ 15. ปริมาณโปรตีน ไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรท ไขมัน และฟอสเฟตในน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด

สารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำสกัดจากหอยสองฝา	ปริมาณสารในน้ำสกัดจากหอยสองฝา (กรัม/100 มล.)			
	หอยทรายระยะพิษสูง	หอยทรายระยะพิษต่ำ	หอยกระปุก	หอยรูปหัวใจ
โปรตีน	0.109	0.108	0.106	0.112
ไนโตรเจน	0.10	0.08	0.10	0.10
คาร์โบไฮเดรท	9.17×10^{-3}	9.92×10^{-2}	8.20×10^{-3}	7.92×10^{-3}
ไขมัน	0.323	0.458	0.168	0.378
ฟอสเฟต	8.40×10^{-3}	1.21×10^{-2}	1.11×10^{-2}	1.61×10^{-2}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16. ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในน้ำสกัดจากหอยสองฝา

ชนิดของกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในน้ำสกัด (กรัมต่อน้ำสกัด 100 มล.)			
	หอยทราย, พิษสูง	หอยทราย, พิษต่ำ	หอยกระปุก	หอยรูปหัวใจ
กรดแอสพาติค	7.50×10^{-3}	1.48×10^{-2}	1.73×10^{-2}	1.01×10^{-2}
ทรีโอนีน	6.40×10^{-3}	7.70×10^{-3}	8.60×10^{-3}	5.80×10^{-3}
เซอรีน	3.20×10^{-3}	6.70×10^{-3}	5.80×10^{-3}	4.70×10^{-3}
กรดกลูตามิค	1.34×10^{-2}	2.11×10^{-2}	2.74×10^{-2}	1.49×10^{-2}
โพรลีน	trace	6.00×10^{-4}	trace	trace
ไกลซีน	9.00×10^{-3}	1.26×10^{-2}	2.34×10^{-2}	2.91×10^{-2}
อลานีน	3.40×10^{-3}	7.80×10^{-3}	1.50×10^{-2}	5.90×10^{-3}
วาลีน	5.20×10^{-3}	6.60×10^{-3}	8.00×10^{-3}	4.30×10^{-3}
ซีสทีน	1.80×10^{-3}	3.10×10^{-3}	3.80×10^{-3}	2.60×10^{-3}
เมทไธโอนีน	1.20×10^{-3}	2.80×10^{-3}	3.20×10^{-3}	1.00×10^{-3}
ไอโซลิวซีน	3.10×10^{-3}	5.40×10^{-3}	7.60×10^{-3}	3.60×10^{3}
ลิวซีน	4.50×10^{-3}	7.90×10^{-3}	1.09×10^{-2}	3.60×10^{-3}
ไทโรซีน	1.20×10^{-3}	2.90×10^{-3}	4.30×10^{-3}	1.30×10^{-3}
ฟีนิลอลานีน	2.00×10^{-3}	7.20×10^{-3}	7.40×10^{-3}	5.70×10^{-3}
ไลซีน	4.30×10^{-3}	7.90×10^{-3}	8.80×10^{-3}	3.30×10^{-3}
ฮีสทิดีน	1.00×10^{-3}	2.30×10^{-3}	1.70×10^{-3}	1.20×10^{-3}
อาร์จินีน	3.10×10^{-3}	5.40×10^{-3}	9.00×10^{-3}	2.10×10^{-3}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในปริมาณสูง,ต่ำและไม่สร้างในที่นี้ใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยดูการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A หลังจากเติมสารกีดขวางช่องโซเดียมลงไปในเซลล์ที่เติมสารวอบาย ซึ่งมีฤทธิ์ไปยับยั้งเอนไซม์ Na^+-K^+-ATPase และเติมเวอราตริดีน ซึ่งทำให้เกิดการไหลของโซเดียมอิออนเข้าเซลล์เป็นจำนวนมาก ถ้าการอยู่รอดของเซลล์เกิน 20% ขึ้นไปเมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบจึงถือว่าสารนั้นมีสมบัติเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียม (กาญจณา,2536) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสร้างพิษคือเชื้อ G, H และ I ซึ่งมีการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A เท่ากับ 13.72%, 12.94% และ 15.80% ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์ดูความเป็นพิษของเนื้อหอยทรายที่มีพิษสูงและพิษต่ำ พบว่าเฉพาะเนื้อหอยทรายในระยะพิษสูงเท่านั้นที่พบสารพิษ ส่วนเนื้อหอยชนิดอื่นๆและหอยทรายในระยะพิษต่ำไม่พบว่ามีความเป็นพิษ ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Saitanu และคณะ (1992) ที่พบว่าหอยทราย ณ.แหล่งเดียวกันนี้มีความเป็นพิษในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายน และมีความเป็นพิษต่ำในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม ส่วนผลในการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารพิษเป็นพวกอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน

ในการทดสอบดูความเป็นพิษของทรายและน้ำทะเลบริเวณที่เก็บตัวอย่างหอยสองฝาซึ่งจัดเป็นสิ่งแวดล้อมรอบๆ ตัวหอย พบว่าสารสกัดจากทรายและน้ำทะเลที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูงมีความเป็นพิษสูงด้วย และการทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกมีผลให้ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมเพิ่มสูงกว่าการสกัดแบบปกติ ขณะเดียวกันได้พบอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินทั้งในทรายและน้ำทะเลในระยะหอยทรายพิษสูงด้วย ส่วนอนุพันธ์ GTX1 และ GTX4 พบเฉพาะในน้ำทะเลที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีอนุภาคบางชนิดที่มี GTX1 และ GTX4 ปะปนอยู่ในน้ำทะเล โดยอนุภาคนั้นอาจเป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ เนื่องจากสอดคล้องกับรายงานของ Kodama และคณะ (1990) พบว่าแบคทีเรียสร้างพิษ *Moraxella* sp. ที่แยกได้จากไดโนแฟลกเจลเลตมีพิษสามารถสร้างสารพิษกลุ่มกอนิออทอกซินคือ GTX1 และ GTX4 ได้ปริมาณสูง หรืออาจ

เป็นไดโนแฟลกเจลเลตชนิดมีพิษกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยแต่ในกรณีหลังนี้เป็นไปได้น้อยมาก เนื่องจากเก็บน้ำทะเลในบริเวณน้ำตื้นมากและเก็บปริมาณต่ำ จึงมีโอกาสพบไดโนแฟลกเจลเลตมีพิษในน้ำทะเลน้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่ชี้ให้เห็นว่าอนุภาคที่มีพิษอาจเป็นแบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในน้ำทะเล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hamasaki และคณะ (1994) พบว่าในน้ำทะเลมีอนุภาคที่มีพิษแขวนลอยอยู่ โดยอนุภาคนี้เกาะกับมูลของสัตว์ทะเลขนาดเล็กและบางส่วนจะจมอยู่ในทะเลรวมกับดินตะกอนอื่นๆ ดังนั้นดินตะกอนในทะเลจึงมีอนุภาคที่เป็นแหล่งสะสมเทโทรโดทอกซินทำให้สัตว์ที่มากินอาหารบริเวณดินตะกอนได้รับสารพิษเข้าไปและเกิดการหมุนเวียนของสารพิษในระบบห่วงโซ่อาหาร ส่วนสารสกัดจากทรายและน้ำทะเลที่มีการทำให้อนุภาคที่ปนอยู่แตกที่เก็บในระยะหอยทรายพิษต่ำไม่พบอนุพันธ์ชนิดใด อย่างไรก็ดีได้ตรวจพบว่ามีสารกีด-ขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปริมาณต่ำ ซึ่งข้อขัดแย้งนี้อาจเนื่องมาจากการตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการตรวจหาสารที่มีกลไกไปกีดขวางช่องโซเดียมทุกประเภทโดยไม่เจาะจงว่าเป็นอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซินหรืออนุพันธ์กลุ่มพิษอัมพาตจากหอยเท่านั้น เนื่องจากสารกีดขวางช่องโซเดียมยังมีอนุพันธ์อีกหลายกลุ่ม แต่มีการศึกษากันน้อย (Kogure et al., 1988) แสดงว่าสิ่งแวดล้อมบริเวณที่หอยทรายอาศัยอยู่ในระยะหอยทรายมีพิษสูงมีอนุภาคที่มีพิษปนเปื้อนอยู่มากกว่าในระยะหอยทรายมีพิษต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Juntongjin และคณะ (1994) พบว่าระยะหอยทรายมีพิษสูงจะมีแบคทีเรียสร้างพิษในหอยและดินตะกอนบริเวณที่หอยอาศัยอยู่ในปริมาณสูง ส่วนในระยะหอยทรายมีพิษต่ำจะพบแบคทีเรียดังกล่าวในหอยและดินตะกอนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด สรุปได้ว่าพิษในหอยอาจเกิดจากอนุภาคซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมและมีปัจจัยบางอย่างในหอยทรายที่มีผลต่อการสร้างสารพิษในแบคทีเรียที่สะสมอยู่ในหอย

ในการที่จะหาทางพิสูจน์ว่ามีปัจจัยใดบ้างที่มาเกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษของแบคทีเรียในระยะที่หอยมีความเป็นพิษสูง สิ่งที่น่าจะเป็นไปได้อีกประการหนึ่งคือหอยทรายในระยะที่มีพิษสูงอาจจะมีปัจจัยบางอย่างในตัวหอยเองเป็นตัวเสริมให้มีการผลิตสารพิษเพิ่มขึ้นในแบคทีเรีย ดังนั้นการนำหอยทรายในระยะความเป็นพิษที่ต่างกันมาเตรียมน้ำสกัดและใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียจึงเป็นหนทางอันหนึ่งในการหาสาเหตุของกระบวนการเกิดสารพิษในหอยทราย จากการเตรียมน้ำสกัดจากหอยสองฝาแล้วนำมาหาความเป็นพิษ พบว่ามีสารกีดขวางช่องโซเดียมเฉพาะน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงและเมื่อนำไปตรวจหาชนิดของอนุพันธ์ของสารพิษพบว่าเป็นอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน อนุพันธ์แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซินและ C3 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามี

ความเป็นพิษไม่สูงมาก เนื่องจากใช้เนื้อหอยเพียง 10% ส่วนน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษต่ำและน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดไม่มีพิษไม่มีความเป็นพิษและไม่พบอนุพันธ์ชนิดใด และเมื่อนำน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงมาผสมกับน้ำทะเลสังเคราะห์ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 75% พบว่าความเป็นพิษของน้ำสกัดลดลง โดยมีการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A เพียง 18.23% ซึ่งถือว่าไม่มีความเป็นพิษ ดังนั้นจึงไม่มีผลกระทบต่อการทดลองหากมีการสร้างสารพิษเพิ่มขึ้นก็จะสังเกตเห็นได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์และนอกจากนี้หลังจากเก็บเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3M. 2 ครั้ง ซึ่งเป็นการล้างเอาส่วนของอาหารที่อาจมากับเซลล์ออกไปด้วย

เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมีการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากอาหารเหลวเป็นอาหารที่มีแหล่งสารอาหารที่จำเป็นครบถ้วน และเชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่าย ส่วนการเจริญของแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอย พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) มีปริมาณน้อย แต่ค่าความขุ่นของเซลล์ใกล้เคียงกับในอาหารชนิดอื่น ซึ่งอาจเกิดจากมีสารบางอย่างในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจมีผลทำให้การแบ่งเซลล์ในน้ำสกัดช้าลงแต่มีมวลเซลล์ (cell mass) เพิ่มขึ้น ซึ่งพบลักษณะเช่นนี้ในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ที่นำมาศึกษา และจากรายงานของ Kogure และคณะ (1979) พบว่ากรดนาลิดิซิค (nalidixic acid) มีผลต่อการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงคาดว่าในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจอาจมีสารที่มีกลไกคล้ายคลึงกับกรดนาลิดิซิค

จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง (A, B, C) และสร้างพิษต่ำ (D, E, F) เมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ปริมาณสูงกว่าในอาหารชนิดอื่น และแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงสร้างได้ปริมาณสูงกว่าสารที่สร้างจากแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำ เมื่อพิจารณาสารกีดขวางช่องโซเดียมจากสารสกัดภายนอกเซลล์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มมีการสร้างสารพิษภายนอกเซลล์ในปริมาณสูง เมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูง ส่วนสารสกัดภายในเซลล์พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะมีสารพิษภายในเซลล์มากกว่าเลี้ยงในอาหารชนิดอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อมีการเจริญในอาหารเหลวสูงกว่าในอาหารชนิดอื่น ทำให้ได้ปริมาณของสารสกัดจากเซลล์มาก แต่อย่างไรก็ดีมีระดับความเป็นพิษต่ำกว่าสารจากเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของกาญจณา (2536) พบว่าแบคทีเรียที่มีการเจริญต่ำจะมีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมที่มีความเป็นพิษสูงกว่าเชื้อที่มีการเจริญสูง

เมื่อเปรียบเทียบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยเชื้อเจริญในน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดและอาหารเหลวโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบภายหลัง (Duncan's multiple range test) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.01 (ภาคผนวก ค ข้อ 9) โดยการกำหนดให้การสร้างสารพิษในอาหารเหลวเป็นตัวควบคุมแล้วเปรียบเทียบกับการสร้างสารพิษในแบคทีเรียทั้งสามกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังในตารางที่ 17.

สรุปได้ว่าการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงและพิษต่ำเมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายพิษสูงมีปริมาณมากกว่าในอาหารเหลวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% แสดงให้เห็นว่าน้ำสกัดจากหอยทรายพิษสูงอาจมีสารบางชนิดที่มีผลให้แบคทีเรียสร้างพิษได้สูงขึ้น ส่วนการสร้างสารพิษของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงในน้ำสกัดจากหอยกระปุกและหอยทรายพิษต่ำมีปริมาณน้อยกว่าในอาหารเหลวอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำสกัดจากหอยชนิดอื่นรวมทั้งหอยทรายระยะพิษต่ำไม่มีผลใดต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย เช่นเดียวกับการสร้างสารพิษของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำ (เชื้อ F) ในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจและหอยกระปุกมีปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ยกเว้นเชื้อ D เพียงเชื้อเดียวเมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยกระปุกจะมีการสร้างสารพิษมากกว่าในอาหารเหลว ซึ่งผลการทดลองนี้อาจเกิดขึ้นได้กับแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมบางชนิด พบว่าปริมาณการสร้างสารพิษไม่คงที่ในบางภาวะอาจสูง บางภาวะอาจต่ำ

ตารางที่ 17. ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติของการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

กลุ่มแบคทีเรีย	จำนวนเชื้อในน้ำสกัดแต่ละชนิดที่สร้างสารพิษแตกต่างจากอาหารเหลว (สายพันธุ์)			
	หอยทราย, พิษสูง	หอยกระปุก	หอยรูปหัวใจ	หอยทราย, พิษต่ำ
สร้างพิษสูง	3	1	0	1
สร้างพิษต่ำ	3	2	1	0
ไม่สร้างพิษ	1	0	1	1

สำหรับการตรวจหาชนิดของอนุพันธ์ของสารพิษเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงสามารถตรวจพบอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน (ตารางที่ 3และ 4) และตรวจพบอนุพันธ์ STX, NSTX, DSTX, GTX4, C1 และ C4 โดยเฉพาะในสารสกัดจากภายนอกเซลล์ พบอนุพันธ์ STX, NSTX และ DSTX ในปริมาณสูงมาก เช่นสารสกัดภายนอกเซลล์จากเชื้อ A พบ STX, NSTX และ DSTX 2.652, 20.028 และ 0.354 นาโนโมลต่อมล. ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากภายนอกเซลล์จากเชื้อ D พบ STX, NSTX และ DSTX 3.406, 15.569 และ 1.935 นาโนโมลต่อมล.ตามลำดับ โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Massaki Kodama จากมหาวิทยาลัย Kitasato ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งไม่ได้แสดงผลไว้ในผลการทดลอง ในขณะที่สารสกัดจากแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นจะพบบางอนุพันธ์หรือไม่พบอนุพันธ์ชนิดใดเลยและมีปริมาณต่ำ แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของสารพิษจะพบในแบคทีเรียที่เลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงมากกว่าอาหารชนิดอื่น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการสร้างอนุพันธ์กลุ่ม TTXs และกลุ่ม STXs ได้มากขึ้นกว่าองค์ประกอบชนิดอื่น

ส่วนแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ (G, H, I) ตรวจพบสารกีดขวางช่องโซเดียมได้เฉพาะสารจากภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด และมีปริมาณต่ำมาก แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษมีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมแต่ไม่มีการสะสมไว้ภายในเซลล์ โดยสารพิษอาจเกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อนำสารนี้ไปใช้ทำหน้าที่ทางสรีรวิทยา (Mosher and Fuhrman, 1984) โดยอาจเปลี่ยนจากกรดไรโบนิวคลีอิค (ribonucleic acid) ไปเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมเพราะสารพิษนี้มีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่กัวนิดิเนียมเช่นเดียวกับกรดไรโบนิวคลีอิคทำให้สามารถตรวจพบสารกีดขวางช่องโซเดียมได้จากแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ และนอกจากนี้มีรายงานว่า *E. coli* สามารถสร้างสารพิษชนิดนี้ได้ (Hashimoto et al., 1990) แบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณสารพิษและความเป็นพิษใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแต่ละชนิดและไม่พบอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซิน ส่วนอนุพันธ์กลุ่มพิษอัมพาตจากหอยคือ STX, NSTX, DSTX และ GTX4 พบในปริมาณต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิดและอาหารเหลว โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและการวิเคราะห์เปรียบเทียบภายหลังที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01 (ภาคผนวก ค ข้อ 9) สรุปได้ดังตารางที่ 17. โดยพบว่าการสร้างสารพิษของแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษเฉพาะเชื้อ G เมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายพิษสูงและหอย

รูปหัวใจมีปริมาณมากกว่าในอาหารเหลวอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% แต่มีปริมาณแตกต่างกันไม่มาก แต่ในเชื้อ H ที่เจริญในน้ำสกัดจากหอยทรายพิษต่ำมีการสร้างสารพิษน้อยกว่าในอาหารเหลวอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ส่วนการสร้างสารพิษของเชื้อ I ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% แสดงให้เห็นว่าน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำไม่มีผลให้แบคทีเรียสร้างพิษได้สูงขึ้น

สรุปได้ว่าน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงมีสารบางชนิดที่มีผลไปส่งเสริมให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงและสร้างพิษต่ำสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงขึ้นแต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ และสารนี้ไม่พบในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำและน้ำสกัดจากหอยไม่มีพิษทั้งสองชนิดหรืออาจมีสารบางชนิดไปเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษต่ำให้เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kotaki และคณะ(1985) พบว่าเมื่อบ่มเชื้อ *Pseudomonas* sp.และ *Vibrio* sp. กับเนื้อเยื่อของปูชนิดมีพิษ *(Atergatis floridus)* พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ GTXs ไปเป็นอนุพันธ์ STXs โดยการกำจัดไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 ของหมู่ไฮดรอกซิล (N-11 hydroxyl group) และคาร์บอนตำแหน่งที่ 11 ของหมู่ไฮดรอกซิลซัลเฟต (C-11 hydroxylsulfate group)

จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีพบว่าปริมาณโปรตีน ไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรทในน้ำสกัดจากหอยแต่ละชนิดมีปริมาณใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าสารพวกโปรตีนและคาร์โบไฮเดรท ซึ่งเป็นสารประกอบหลักมีปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณไขมันน้ำสกัดจากหอยกระปุกมีปริมาณไขมันต่ำสุด และน้ำสกัดจากหอยสองฝาอีกสามชนิดมีปริมาณใกล้เคียงกัน จากที่กล่าวมาแล้วว่าหอยกระปุกเป็นหอยที่มีขนาดเล็กจึงอาจมีการสะสมไขมันในปริมาณที่ต่ำกว่าหอยทรายและหอยรูปหัวใจ

Gallacher และBirkbeck (1993) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Alteromonas tetraodonis* เพื่อให้ผลิตสารเทโทรโดทอกซินในระยะที่มีจำนวนเซลล์คงที่ (stationary phase) พบว่าการสร้างเทโทรโดทอกซินจะลดลงมากกว่า 90% เมื่อเติมฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 ไมโครกรัมต่อ มล. ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตมีผลต่อการสร้างเทโทรโดทอกซินของแบคทีเรียและจากการวิเคราะห์หาปริมาณของฟอสเฟตจากน้ำสกัดจากหอยสองฝาในการทดลองครั้งนี้ พบว่ามีปริมาณฟอสเฟตจากตัวอย่างน้ำสกัดหอยทรายที่เก็บในระยะพิษสูงน้อยกว่าในหอยทรายที่เก็บในระยะพิษต่ำ จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษในระยะหอยทรายพิษสูงมีฟอสเฟตเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการสังเคราะห์สารพิษดังกล่าว

มีรายงานว่ากรดอะมิโนบางชนิดเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์กลุ่มซัคซิ-ทอกซิน เช่น อาร์จินีน ไกลซีน และเซอรีน เป็นต้น (Shimizu et al., 1985) ดังนั้นจึงทำการวัดปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในน้ำสกัดจากหอยสองฝา พบว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงส่วนใหญ่มีปริมาณต่ำกว่าน้ำสกัดชนิดอื่น แต่เมื่อนำมาคิดเป็นอัตราส่วนของกรดอะมิโนชนิดนั้นต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดจะมีปริมาณใกล้เคียงกันในน้ำสกัดทุกชนิด ดังนั้นกรดอะมิโนจึงไม่น่าเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์สารพิษของแบคทีเรีย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงอาจมีสารบางชนิดที่มีผลให้แบคทีเรียสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพิษในสัตว์ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่อย่างไรก็ตามสาเหตุการเกิดพิษในสัตว์ยังไม่ทราบแน่ชัด Mosher และ Fuhrman (1984) สรุปสาเหตุที่อาจเป็นไปได้ในการเกิดพิษของสัตว์ทะเลดังนี้

1. Endogenous เกิดจากสัตว์สร้างสารพิษขึ้นมาเองจากขบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งอาจเป็นผลิตผลที่ไม่ได้เกิดขึ้นตามปกติ แต่สร้างขึ้นเพื่อความอยู่รอด

2. Exogenous สัตว์ไม่ได้สร้างขึ้นเอง แต่ได้รับสารพิษจากแหล่งภายนอก เช่น ห่วงโซ่อาหารเนื่องจากมีการสะสมสารพิษในระบบห่วงโซ่อาหาร ทำให้สัตว์ที่กินอาหารในระบบนั้นได้รับสารพิษเข้าไป

3. Symbiotic microorganisms สารพิษอาจสร้างมาจากจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับ สัตว์มีพิษ โดยช่วยกันส่งเสริมหรือชักนำให้เกิดการสร้างสารพิษ

4. Multiple origins อาจเกิดจากทั้งสามสาเหตุข้างต้นรวมกัน

สำหรับผลการทดลองที่ได้จากการวิจัยนี้สรุปได้ว่าน่าจะมีปัจจัยบางอย่างในหอยทรายระยะพิษสูงที่มีผลไปส่งเสริมให้แบคทีเรียสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงขึ้น แต่หอยทรายระยะพิษต่ำ หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจอาจไม่มีสารนี้ หอยทรายในระยะพิษสูงกับแบคทีเรียสร้างพิษอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้หอยทรายมีพิษเนื่องจากหอยทรายในระยะพิษสูงได้รับแบคทีเรียสร้างพิษจำนวนมากและมีการสะสมไว้ในตัวหอยมากกว่าหอยทรายในระยะพิษต่ำ หรือมีการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษต่ำให้มีความเป็นพิษสูงขึ้นจึงมีผลทำให้หอยทรายในระยะพิษสูงมีปริมาณสารพิษมากกว่าหอยทรายในระยะพิษต่ำ สำหรับหอยไม่มีพิษที่นำมาศึกษาถึงแม้ว่าจะอยู่ในบริเวณเดียวกับหอยทราย และมีโอกาสได้รับแบคทีเรียสร้างพิษแต่หอยไม่มีพิษอาจไม่มีกลไกบางอย่างที่ทำให้เกิดพิษในตัวหอยเช่นเดียวกับหอยทราย หอยชนิดอื่นจึงไม่เกิดการสะสมแบคทีเรียสร้างพิษและไม่มีการเสริมให้สร้างสารพิษได้สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสร้าง

พิษอาจเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดพิษในสัตว์ทะเล ซึ่งจะเป็นแนวทางให้เกิดความคิดใหม่ที่พบว่าพิษประเภทสารกีดขวางช่องโซเดียมในสัตว์ทะเลอาจเกิดจากแหล่งภายนอกคือแบคทีเรียที่สร้างสารพิษเหล่านี้

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สนับสนุนความคิดที่ว่าแบคทีเรียสร้างพิษเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดพิษในหอยทราย ทั้งนี้เมื่อนำแบคทีเรียตัวอย่างมาเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยสองฝาทั้ง 3 ชนิด พบว่าน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงทำให้แบคทีเรียสร้างพิษสามารถสร้างพิษได้สูงขึ้น ดังนั้นจึงควรศึกษาต่อไปถึงภาวะของหอยทรายเปรียบเทียบกับหอยกระปุกหรือหอยรูปหัวใจที่เก็บจากแหล่งเดียวกันเมื่อได้รับแบคทีเรียสร้างพิษ โดยศึกษาว่าหอยทรายและหอยไม่มีพิษมีกลไกแตกต่างกันอย่างไรในการรับและสะสมแบคทีเรียสร้างพิษ ตลอดจนความเป็นพิษของหอยทรายจะเปลี่ยนแปลงอย่างไร และนอกจากนี้ยังควรศึกษาถึงกลไกการสร้างสารพิษของแบคทีเรีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กาญจณา จันทองจีน. 2536. ผลของน้ำสกัดจากหอยทราย (*Asaphis violascens*) ต่อการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย. รายงานผลทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 18 หน้า.

กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์, ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม, สุนันท์ นครชัย, สุวิทย์ เพียรกิจกรรม และอรทัย สเวนด์สปี .2521. ปฏิบัติการ และหลักเบื้องต้นในวิชาชีวเคมี. คณะแพทย์-ศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร, 358 หน้า.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุมน. 2535. คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมไทย (สวสท.) และ World Environment Center (WEC), กรุงเทพมหานคร, 410 หน้า.

ธารา ตริตระการ, เทพกร สาธิตการมณี, บุญเจือ ธรณินทร์ และประดิษฐ์ เจริญไทยทวี. 2523. ฤทธิ์ยาชาเฉพาะที่ของพิษปลาปักเป้า (Long action local anesthetic properties of tetrodotoxin for epidural and spinal anesthesia in dog) วิสัญญีสาร. 7: หน้า 125-134.

นันทวัน ฤทธิ์เดช. 2536. การจำแนกสปีชีส์แบคทีเรียทะเลที่อาจมีความสัมพันธ์กับหอยกระปุกและสิ่งแวดล้อม. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 30 หน้า.

เบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย. 2535. การจำแนกสปีชีส์แบคทีเรียทะเลที่สร้างเทโทรโดทอกซินและการตรวจหาเทโทรโดทอกซินโดยวิธี tissue culture assay. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 57 หน้า.

วรพรรณี พจนสุนทร. 2536. การจำแนกสปีชีส์แบคทีเรียทะเลที่อาจมีความสัมพันธ์กับหอยทรายและสิ่งแวดล้อม. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 34 หน้า.

วิชญา เทียนทองดี. 2535. แบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในหอยสองฝาชนิดที่มีพิษและไม่มีพิษที่เก็บจากบริเวณเกาะสีชัง. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 34 หน้า.

ศิริโฉม เหลืองอ่อน. 2534. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยแบคทีเรียที่แยกจากหอยแมลงภู่ (*Perna viridis* Linn). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 95 หน้า.

ศุภผล เทพเฉลิม 2527. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ใช้เป็นอาหารในภาคใต้ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต.. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 224 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Abbott, R.T. 1968. A Guide to Field identification Sea Shells of North America. New York, Golden Press, pp. 280.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis: Association of Official Analytical Chemists. In K..Helrich (ed.), Virginia, USA.pp. 1298.

Beckman Instruction Manual. 1985. The System 6300 Series High Performance Amino Acid Analysers. Beckman Instrucment Inc., USA.

Bower, D.J., Hart, R.J., Matthews, P.A., and Howden, M.E.H. 1981. Nonprotein neurotoxins. Clinical Toxicology. 18(7): 813-863.

Boyer, G.L., Sallivan, J.J., Anderson, R.J., Harison, P.J., and Taylor F.J.R. 1985. Toxin production in three isolated of *Protogonyaulax* sp. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G.Baden (eds.) Toxic Dinoflagellate. New York, Elsevier: pp. 52-61.

Buckle, L.J., Ikawa, M., and Sasner, J.J. 1976. Isolaion of *Gonyaulax tamarensis* toxins from soft shell clams (*Mya arenaria*) and a thin layer chromatographic-fluorometric method for their detection. J.Agric.Food Chem. 24(1): 107-111.

Budavari, S. O'Neil, M.J., Smith, A., and Heckelman, P.E. 1989. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, drugs and Biological. New Jersey, Merck & Co.,Inc., pp. 10100.

Catlerall, W.M. 1985.The voltage sensitive sodium channel: A receptor for muliple neurotoxins. In D.M.Anderson, A.W. White, and D.G.Baden (eds.) Toxic dinoflagellate. New York, Elsevier: pp. 329-342.

Do, H.K., Hamasaki, K., Ohwada, K., Simidu, U., Noguchi, T., Shida, Y., and Kogure, K. 1993. Presence of tetrodotoxin and tetrodotoxin-producing bacteria in freshwater sediments. Appl.Environ.Microbiol. 59(11): 3934-3937.

_____., Kogure, K., and Simidu, U. 1990. Identification of deep sea sediment bacteria Which produced tetrodotoxin. Appl.Environ.Microbiol. 56: 1162-1163.

_____., Kogure, K., Imada, C., Noguchi, T., Ohwada, K., and Simidu,U. 1991. Tetrodotoxin production of actinomycetes isolated from marine sediment. J.Appl.Bacteriol. 70: 464-468.

Evans, M.H. 1972. Tetrodotoxin, saxitoxin, and related substances:Their applications in neurobiology. Int.Rew.Neurobiol. 15: 83-163.

Fallon, W.E., and Shimizu, Y. 1977. Electrophoretic analysis of paralytic shellfish toxins. J. Environ.Sci.Health. A12(9): 455-464.

Fuhrman, F.A. 1986. Tetrodotoxin, Tarichatoxin, and Chiriquitoxin: Historical Perspectives. In C.Y. Kao, and S.R.Levinson (eds.) Annals New York Academy of Sciences. 479: 1-13.

Gallacher, S.,and Birkbeck, T.H. 1993. Effect of phosphate concentration on production of tetrodotoxin by *Alteromonas tetraodonis*. Appl.Environ.Microbiol. 59(11): 3981-3983.

Hamasaki, K., Kogure, K., Noguchi, T., Shida, Y.,and Ohwada, K. 1994. Tetrodotoxin in sinking particles from coastal waters. Marine Biology. 118: 761-765.

Harada, T., Oshima Y., and Yasumoto, T. 1982. Structures of two paralytic shellfish toxins, gonyautoxins V and VI, isolated from a tropical dinoflagellate, *Pyrodinium bahamense* var *compressa* J.Agric.Biol.Chem. 46(7): 1861-1864.

Hashimoto, K., Noguchi, T., and Watabe, S. 1990. New aspects of tetrodotoxin. In A.E. Pohland, Jr.V.R.Dowell, J.L.Richard (eds.) Microbial Toxins in Foods and Feeds. New York: Plenum Press, pp. 575-588.

Heftman, E. 1975. Chromatography: A Laboratory Hand Book of Chromatographic and Electrophoretic Methods. New York, Van Nostrand Reinhold Company: pp. 969.

Hwang, D.F., Arakarra,O., Saito,T., Noguchi,T., Simidu,U., Tsukamoto, K., Shida, Y., and Hashimoto, K. 1989. Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue ringed octopus (*Octopus maculosus*) Marine Biology. 100: 327-332.

_____., Chueh, C.H., and Jeng, S.S. 1990. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Natica lineata* (Lined moon shell). Toxicon. 23(2): 271-276.

Juntongjin, K., Piyakarnchana, T., Kogure, K., Simidu, U.,and Ohwada, K. 1993. Sodium channel blocker producing bacteria isolated from the the Gulf of Thailand. J.Mar.Biotechnol. 1: 93-96.

_____., Piyakarnchana, T., Kodama, M., Ohwada, K., and Simidu, U. 1995. Toxins similar to PSP and TTxs produced by bacteria associated with sand clam (*Asaphis* violascens) in the Gulf of Thailand. J.Mar.Biotechnol. (in press)

Kamiya, H.,and Hashimoto, Y. 1978. Occurrence of saxitoxin and related toxins in palauan bivalves. Toxicon. 16: 303-306.

Kao, C.Y. 1972. Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. Fed.Proc. 31: 1117-1131.

_____. 1982. Actions of nortetrodotoxin on frog muscle and squid axon. Toxicon. 20(6): 1043-1050.

_____.1986. Structure-activity relations of tetrodotoxin,saxitoxin and analogues. In C.Y. Kao and S.R. Levinson (eds.) Annals New York Academy of Sciences. 479: 52-59.

_____., and Nishiyama, A. 1965. Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. J.Physiol. 180: 50-66.

_____., and Walker, S.E. 1982. Active groups of saxitoxin and tetrodotoxin as deduced from actions of saxitoxin analogues on frog muscle and squid axon. J.Physiol. 323: 619-637.

Kim, Y.H., Brown, G.B., Mosher, H.S.,and Fuhrman, F.A. 1975. Tetrodotoxin: Occurrence in alelopid frogs of costa rica. Science. 189: 151-152.

Kodama, M. 1985. Possible links between bacteria and toxin production in algal blooms. In D.M.Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.) Toxic Dinoflagellate. New York, Elsevier: pp. 52-61.

Kodama, M., and Ogata, T. 1988. Toxification of bivalves by paralytic shellfish toxins. Asia Pacific Journal of Pharmacology. 3: 99-109.

_____., Noguchi, T., Maruyama, J., Ogata, T., and Hashimoto, K. 1983. Release of tetrodotoxin and paralytic shellfish poison from puffer liver by RNase. J.Biochem. 93: 243-247.

_____., Ogata, T., Noguchi, TT., Maruyama, J., and Hashimoto, K. 1983. Occurrence of saxitoxin and other toxins in the liver of the pufferfish *Takifugu pardalis*. Toxicon. 21 (6): 897-900.

_____., Ogata, T., Sakamoto, S., Sato, S., Honda, T.,and Miwatani, T. 1990. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis* Toxicon. 28(6): 707-714.

_____., Ogata, T., Sato, S., and Sakamoto, S. 1990. Possible association of marine bacteria with paralytic shellfish toxicity of bivalves. Mar.Ecol.Prog.Ser. 61: 203-206.

Kogure, K., Do., H.K., Thuesen, E.V., Nanba, K., Ohwada, K.,and Simidu, U. 1988. Accumulation of tetrodotoxin in marine sediment. Mar.Ecol.Prog.Ser. 45: 303-305.

_____., Tamplin, M.L., Simidu, U., and Cowell, R.R. 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. Toxicon. 26(2): 191-197.

_____., Simidu, U., and Taga, N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can.J.Microbiol. 25: 415-420.

Kotaki, Y., Oshima, Y., and Yasumoto,T. 1985. Bacterial transformation of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and a marine snail. Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish. 51(6): 1009-1013.

Kungsuwan, A., Nagashima, Y., Noguchi, T., Shida, Y., Suvapeepan, S., Suwansakornkul, P.,and Hashimoto, K. 1988. ,Tetrodotoxin in the eggs of horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* inhabiting Thailand. Nippon Suisan Gakkaishi. 53: 261-266.

Laobhripatr, S., Limpakarnjanarat, K., Sangwanloy, O.,Sudhasaneya, S., Anuchatvorakul, B., Leelasitorn, S.,and Saitanu, K. 1990. Food poisoning due to consumption of the freshwater puffer tetraodon fangi Thailand. Toxicon. 28(11): 1372-1375.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193: 265-275.

McLaren, J.W., Berman, S.S., Boyko, V.J., and Russel, D.S. 1981. Simultaneous determination of major, minor, and trace plasma atomic emission spectrometry. Anal.Chem. 53: 1802-1806.

Mosher, H.S., and Fuhrman, F.A. 1984. Occurrence and origin of tetrodotoxin. In E.P.Rajelis (ed.) Seafood Toxins. Washingon D.C., American Chemical Society: pp. 333-344.

_____., Fuhrman, F.A., Buchwald, H.D., and Fischer, H.G. 1964. Tarichatoxin-tetrodotoxin : A potent neurotoxin. Science. 144: 1100-1110.

Nagashima, Y., Nishio, S., Noguchi, T., Arakawa, O., Kanoh, S., and Hashimoto, K. 1988. Detection of tetrodotoxin by thin-layer chromatography/ fast atom bombardment mass spectrometry. Anal.Chem. 75: 258-262.

Nakamura, M.,and Yasumoto, T.1985. Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. Toxicon. 23(2): 271-276.

Narita, H., Matsubara, S., Miwa, N., Akahane, S., Murakami, M., Goto, T., Nara, M., Noguchi, T., Saito, T., Shida,Y., and Hashimoto, K. 1987. *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polycanthus*. Nippon Suisan Gakkaishi. 53(4): 617-621.

_____., Noguchi, T.,Maruyama, J.,Ueda, Y.,Hashimoto, K., Watanabe, Y.,and Hida, K. 1981. Occurrence of tetrodotoxin in trumpet shell "Boshubora" *Charonia sauliae*. Bull. Jpn.Soc.Sci.Fish. 47(7): 935-941.

Noguchi, T., Daigo, K., Arakawa, O., and Hashimoto, K. 1985. Release of paralytic shellfish poison from exoskeleton of a xanthid crab *Zosimus aeneus*.. In D.M. Anderson, A.W.White, and D.G. Baden (eds.) Toxic Dinoflagellate. New York, Elsevier: pp. 293-298.

_____., Jeon, J., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y., and Hashimoto, K. 1986. Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from intestines of a xanthid crab, *Altergatis floridus*. J.Biochem. 99(1): 311-314.

_____., and Hashimoto, K. 1973. Isolation of tetrodotoxin from a goby, *Gobius criniger*. Toxicon. 11: 305-307.

_____., Maruyama, J., Narita, H.,and Hashimoto, K. 1984. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk, *Tutufa lissostoma* (frog shell). Toxicon. 22(2): 219-226.

_____., Maruyama, J.,Ueda, Y., Hashimoto, K.,and Harada, T. 1981. Occurrence of tetrodotoxin in the Japanese ivory shell *Babylonia japonica*. Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish. 47: 909-911.

_____., Uzu, A., Daigo, K., Shida, Y., and Hashimoto, K. 1984. A tetrodotoxin-like substance as a minor toxin in the xanthid crab, *Altergatis floridus*. Toxicon. 22(3): 425-432.

Ogata, T., Kodama, M., and Ishimaru, T. 1987. Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. Toxicon. 25: 923-928.

Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraeff, G.,and Blackburn, S. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. Toxicon. 25(11): 1105-1111.

_____., Sugino, K.,and Yasumoto, T. 1989. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. In S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno (eds.) Mycotoxins and Phycotoxins'88. A Collection of Invited Papers Presented at the Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokyo, Japan, 16-19 August: pp. 319-326.

Pavelka, L.A., Kim, Y.H., and Mosher, H.S. 1977. Tetrodotoxin and tetrodotoxin-like compounds from the eggs of the costa rica frog, *Atelopus chiriquiensis*. Toxicon. 15: 135-139.

Proctor, N.H., Chan, S.L., and Trevor, A.J. 1975. Production of saxitoxin by cultures of *Gonyaulax catenella*. Toxicon. 13: 1-9.

Saitanu, K., Laobhripatr, S., Limpakarnjanarat, K., Sangwanloy, O., Sudhasaneya, S., Anuchatvorakul, B., and Leelasitorn, S. 1991. Toxicity of the freshwater puffer fish *Tetraodon fangi* and *T. palembangensis* from Thailand. Toxicon. 29(7): 895-897.

_____., Wisessang, S., Yongvanich,T., Piyakarnchana,T., Ogata,T. Sato, S., and Kodama, M. 1992. Occurrence of toxins similar to paralytic shellfish toxins and tetrodotoxins in green mussel (*Perna viridis*) and sand clam (*Asaphis violascens*) which are not associate with toxic dinoflagellates. In P.Gopalakrishnakone, andC.K.Tan (eds,) Recent

Advance in Toxicology Research. vol.2 Vemon and Toxin Research Group,National University of Singapore, Singapore: pp. 486-493.

Saito, T., Noguchi, T., Harada, T., Murata, O.,and Hashimoto, K. 1985. Tetrodotoxin as a biological defense agent for puffers. Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish. 51(7): 1175-1180.

Sato, S., Komaru, K., Ogata, T.,and Kodama, M. 1990. Occurrence of tetrodotoxin in cultured puffer. Nippon Suisan Gakkaishi. 56(7): 1129-1131.

Schroder, H.G.S.,and Van ES, F.B. 1980. Distribution of bacteria in intertidal sediment of the Ems-Dollard estuary. Neth.J.Sea Res. 14(3/4): 268-287.

Scott, T.A., and Melvin, E.H. 1953. Determination of dextran with anthrone. Anal.Chem. 25: 1656-1661.

Sheumack, D.D., Howden, M.E.H., Spence, I., and Quinn, R.J. 1978. Maculotoxin : A neurotoxin from the vemon glands of octopus *Hepalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin. Science. 199: 188-189.

Shimizu, Y., Alam, M., Oshima, Y., and Fallon, W.E. 1975. Presence of four toxins in red tide infested clams and cultured *Gonyaulax tamarensis* cells. Biochem.Biophys.Res.Commun. 66(2): 731-737.

Shimizu, Y., Fallon, W.E., Wekell, J.C., Gerber, D.,and Gauglitz, E.J. 1978. Analysis of toxic mussels (*Mytilus* sp.) from the Alaskan inside passage. J.Agric.Food Chem. 26(4): 878-881.

_____., Gupta, S., and Prasad, A.V.K. 1990. Biosynthesis of dinoflagellate toxins. In E. Graneli, Bo.Sundstrom, Lars Edler, and D.M.Anderson. Toxic Marine Phytoplankton. New York, Elsevier Science Publishing: pp. 62-77.

_____., Gupta, S., Norte, M., Hori,A., Genenah, A.,and Kobayashi, M. 1985. Biosysthesis of paralytic shellfish toxins. In D.M. Anderson, A.W. White,and D.G. Baden (eds.) Toxic Dinoflagellate. New York, Elsevier: pp. 271-274.

Simidu, U., Lee, W., and Kogure, K. 1983. Comparison of different technique for detecting plate counts of marine bacteria. Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish. 49: 1199-1203.

_____., Noguchi, T., Hwang,D.F., Shida, Y.,and Hashimoto, K.1987. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. Appl. Environ.Microbiol. 53: 1714-1715.

Skoog, D.A.,and Leary, J.J.1994. Principles of Instrumental Analysis. Philadelphia, Saunders College Publishing: pp. 700.

Spackman, D.H., Stein, W.H., and Moore, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal.Chem. 30: 1990.

Tamiyavanich, S., Kodama, M., and Fukuyo, Y. 1985. The occureence of paralytic shellfish poisoning in Thailand. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.) Toxic Dinoflagellate. New York, Elsevier: pp. 521-524.

Tsuda, K., Ikuma, S., Kawamura, M., Tachikawa, R., Sakai, K., Tamura, C., and Amakasu, O. 1964. Tetrodotoxin VII: On structure of tetrodotoxin and its derivatives. Chem. Pharm.Bull. 12(11): 1357-1374.

Wakely, F.J., Fuhrman, G.J., Furman, F.A., Fisher, H.G., and Mosher, H.S. 1968. The occurrence of tetrodotoxin (tarichatoxin) in amphibians and the distribution of the toxin in the organs of newts (taricha). Toxicon. 3: 195-203.

Winge, R.K., Peterson, V.J.,and Fassel, V.A.1979. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy: Prominent lines. Applied Spectroscopy. 33(3): 206-209.

Yamashita, M.Y., Mebs, D.,and Yasumoto, T. 1992. Tetrodotoxin and its analogues in extracts from the toad *Atelopus oxyrhychus* (family: Bufonidae). Toxicon. 30(11): 1489-1492.

Yasumoto, T., and Michishita, T. 1985. Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. Agric.Biol.Chem. 49(10): 3077-3080.

_____., Yasumura, D., Yotsu, M., Michishita, T., Endo, A.,and Kotaki, Y. 1986. Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. Agric.Biol.Chem. 50(3): 793-795.

Yotsu, M., Yamazaki, T., Meguro, Y., Endo, A., Murata, M., Naoki, H., and Yasumoto, T. 1987. Production of tetrodotoxin and s derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a pufferfish. Toxicon. 25(2): 225-228.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	17.53	กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	2.46	กรัม
	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
	โพลีเพปโตน (polypeptone)	5.0	กรัม
	ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
	กลูโคส (glucose)	2.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มล.ปรับความเป็นกรดด่าง 7.5+0.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโออาร์ไอ (ORI medium)

ประกอบด้วย	โพติโอสเพปโตน หมายเลข 3. (proteose peptone NO.3)	1.0	กรัม
	ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.0	กรัม
	ไฟโตน (phytone)	0.5	กรัม
	โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.2	กรัม
	โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3)	0.05	กรัม
	เฟอริคซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	0.04	กรัม
	วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำทะเลสังเคราะห์ปริมาตร 900 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.0-8.0 นำไปต้มให้ละลายและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโออาร์ไอที่ใช้ทำเป็นอาหารสำหรับเก็บเชื้อตั้งต้นเติมวุ้นผงเพียง 8 กรัม และบรรจุลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ แล้ววางเอียง (slant)

3. น้ำทะเลสังเคราะห์ (artificial sea water)

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25.0	กรัม
	ทริสบัฟเฟอร์ ($C_4H_{11}O_3$)	1.0	กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	1.0	กรัม
	แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.0	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.3	กรัม
	กรดบอริค (HBO_3)	2.0	กรัม
	โซเดียมโมลิบเดท ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.5	กรัม
	แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	0.4	กรัม
	ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	50.0	ไมโครกรัม
	คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.4	ไมโครกรัม
	โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	1.0	ไมโครกรัม
	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	50.0	ไมโครกรัม
	วิตามิน บี 12 (vitamine B_{12})	20.0	ไมโครกรัม
	ไบโอติน (biotin)	10.0	ไมโครกรัม

ละลายทริสด้วยน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มล.ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.8 ละลายส่วนผสมแต่ละอย่างแยกกัน แล้วจึงนำมาผสมกันภายหลัง ตามลำดับ และผสมรวมกับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายทริสที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้ว และเติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 1000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้เติมวิตามิน บี12 และไบโอตินที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้ว

หมายเหตุ ดัดแปลงจากสูตรของ Schroder และคณะ (1980) ซึ่งใช้กรดบอริค, โซเดียม-โมลิบเดท และแมงกานีสคลอไรด์หนัก 0.2 มก., 0.5 มก. และ 0.4 มก. ตามลำดับ

4. อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (RPMI medium 1640)

ประกอบด้วย	แอล-อาร์จีนีน (L-arginine)	200.0	มก.
	แอล-แอสพาราจีน (L-asparagine)	50.0	มก.
	แอล-แอสพาร์ติก แอซิด (L-aspartic acid)	20.0	มก.
	แอล-กลูตามิค แอซิด (L-glutamic acid)	20.0	มก.
	แอล-กลูตามีน (L-glutamine)	300.0	มก.
	ไกลซีน (glycine)	10.0	มก.
	แอล-ฮีสทิดีน (L-histidine)	15.0	มก.
	แอล-ซีสทีน (L-cystine)	50.0	มก.
	ไฮดรอกซี-แอล-โพรลีน (hydroxy-L-proline)	20.0	มก.
	แอล-ไอโซลิวซีน (L-isoleucine)	50.0	มก.
	แอล-ลิวซีน (L-leucine)	50.0	มก.
	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์ (L-lysine Hcl)	40.0	มก.
	แอล-เมทไธโอนีน (L-methionine)	15.0	มก.
	แอล-ฟีนิลอลานีน (L-phenylalanine)	15.0	มก.
	แอล-โพรลีน (L-proline)	20.0	มก.
	แอล-ซีรีน (L-serine)	30.0	มก.
	แอล-ทรีโอนีน (L-threonine)	20.0	มก.
	แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan)	5.0	มก.
	แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)	20.0	มก.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอล-วาลีน (L-valine)	20.0	มก.
พารา-อะมิโนเบนโซอิค แอซิค (p-aminobenzoic acid)	1.0	มก.
ไบโอติน (biotin)	0.2	มก.
แคลเซียม แพนโทธิเนต (calcium pantothenate)	0.25	มก.
โคลีนคลอไรด์ (choline chloride)	3.0	มก.
โฟลิค แอซิค (folic acid)	1.0	มก.
อินโนซิทอล (inositol)	35.0	มก.
นิโคตินาไมด์ (nicotinamide)	1.0	มก.
ไพริดรอกซีน ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxine Hcl)	1.0	มก.
ไรโบฟลาวิน (riboflavin)	0.2	มก.
ไทอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine Hcl)	1.0	มก.
วิตามิน บี 12 (vitamine B_{12})	0.005	มก.
เด็กซ์โตรส (dextrose)	2000.0	มก.
กลูตาไทโอน (glutathione)	1.0	มก.
แคลเซียมไนเตรท ($CaNO_3$)	100.0	มก.
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	400.0	มก.
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	100.0	มก.
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	6460.0	มก.
โมโนโซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	1512.0	มก.
ฟินอล เรด (phenol red)	5.0	มก.

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Gibco BRL, USA. 1 ซอง(10.4 กรัม) ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งที่มีปริมาตร 1000 มล. และกรองด้วยกระดาษกรองที่มีความกว้างของช่องขนาด 0.45 ไมครอน และ 0.22 ไมครอน ตามลำดับ เติม Fetal bovine serum ของบริษัท Gibco, USA. 10% โดยปริมาตร บรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อ และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ ก่อนใช้นำออกมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ ประมาณ 15-20 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1% (0.1% acetic acid)

ใช้ลูกยางดูดกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ปริมาตร 0.1 มล.ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มล.ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ (0.3 M NaCl)

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 17.53 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. เติมน้ำให้ครบ 1000 มล. นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเซลล์คัลเจอร์

3.1 สารละลายวอบายเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (10 mM ouabain solution)

ชั่งวอบาย 72.88 มก. (น้ำหนักโมเลกุล 728.8) ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. จนได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มล. ต้มในน้ำเดือดจนละลายหมด บรรจุใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) ปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.2 สารละลายเวอราตริดีนเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (1 mM veratridine solution)

ชั่งเวอราตริดีน 6.738 มก.(น้ำหนักโมเลกุล 673.8) ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล.หยดแอบโซลูทเอทธานอลปริมาตร 3.3 มล.ลงไปละลายช้าๆ เขย่าตลอดเวลาจากนั้นค่อยๆ เติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากเชื้อลงไป เขย่าตลอดเวลาเช่นเดียวกันจนมีปริมาตรครบ 10 มล. บรรจุใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) ปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ-20 °ซ

3.3 สารละลายสำหรับทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงหลุดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์

ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution)

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.25	กรัม
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.75	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	4.55	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ปริมาตรประมาณ 400.0 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.3 และเติมน้ำกลั่นสองครั้งจนมีปริมาตรครบ 500 มล. นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที

ข. สารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA solution)

ประกอบด้วย	ทริปซิน (trypsin)	5.0	กรัม
	โซเดียมอีดีทีเอ (EDTA.4Na)	2.0	กรัม
	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
	น้ำกลั่นสองครั้ง	1000.0	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใช้สารละลายสำเร็จรูปของบริษัท Gibco BRL, USA. ปริมาตร 10 มล. เติมลงในสารละลาย ก. ปริมาตร 90 มล. เก็บในขวดแก้วปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ -20 °ซ และเมื่อนำมาใช้จะนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ

4. สารละลายมาตรฐานเทโทรโดทอกซินเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ (150 uM standard tetrodotoxin solution)

ชั่งสารเทโทรโดทอกซินน้ำหนัก 0.4789 มก. (น้ำหนักโมเลกุล 320) นำไปละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากเชื้อในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. จนมีปริมาตรครบ 10 มล. ซึ่งได้สารละลายของเทโทรโดทอกซินมาตรฐานเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ บรรจุลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเอชพีแอลซี (HPLC)

5.1 สารละลายสำหรับอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซิน

5.1.1 สารละลายโมบายส์เฟส (mobile phase solution)

ประกอบด้วย	อะซีโตไนไตรท์ (CH_3CN)	30.0	มล.
	แกลเซียลอะซีติค แอซิค (CH_3COOH)	3.0	มล.
	เฮปตาฟลูออโรบิวทีริค แอซิค ($C_4HF_7O_2$)	1.0	มล.

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นสองครั้งที่กรองแล้วปริมาตร 900 มล.ใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. และนำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.0 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (Conc.NH_4OH)และสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1000 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

5.1.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มัล (4N NaOH)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์หนัก 80.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งที่กรองผ่านกระดาษกรองที่มีความกว้างของช่องขนาด 0.45 ไมครอน ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. จนมีปริมาตรครบ 500 มล.

5.2 สารละลายสำหรับอนุพันธ์กลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

สารตั้งต้น (stock solution)

ก. สารละลายโซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนต ความเข้มข้น 100 mM.

ชั่งโซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนต ($Na(CH_2)_6CHSO_2OH$) 2.02 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

ข. สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต เข้มข้น 250 mM.

ชั่งโซเดียมฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 44.77 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตรจนมีปริมาตรครบ 500 มล.

ค. สารละลายกรดฟอสฟอริค เข้มข้น 500 mM.

ชั่งกรดฟอสฟอริค (HPO_4) เข้มข้น 85% 28.8 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรเติมน้ำกลั่นสองครั้งจนได้ปริมาตรครบ 500 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ง. สารละลายกรดเปอร์ไอออดิก เข้มข้น 350 mM.

ชั่งกรดเปอร์ไอออดิก(H_5IO_6) 7.89 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

5.2.1 สารละลายโมบายล์เฟส สำหรับวิเคราะห์อนุพันธ์ซัคซิทอกซิน

ผสมสารละลาย ก. 10 มล.และสารละลาย ค. 30 มล.ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 450 มล.และปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.1 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มล. และเติมอะซีโตไนไตรท์ปริมาตร 30 มล. ผสมให้เข้ากัน

5.2.2 สารละลายโมบายล์เฟส สำหรับวิเคราะห์อนุพันธ์กอนิออทอกซิน

ผสมสารละลาย ก. และสารละลาย ค. อย่างละ 10 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 450 มล. และปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.2 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร ครบ 500 มล.

5.2.3 สารละลายตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent)

ผสมสารละลาย ง. 10 มล. และสารละลาย ข. 100 มล.ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล.เติมน้ำกลั่นสองครั้ง 300 มล.ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 9.0 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอก-ไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มล.

5.2.4 สารละลายกรดอะซิติค เข้มข้น 50 mM.

ดูดแกลเซียลอะซิติคแอซิคปริมาตร 0.29 มล.ใส่ในขวดวัดปริมาตรเติมน้ำกลั่นสองครั้งจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ สารเคมีที่นำมาใช้ในการเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเอชพีแอลซี ทั้งหมดเป็นสารเคมีในระดับ HPLC grade หรือระดับ analytical reagent grade และสารละลายที่เตรียมได้นั้น ก่อนนำมาใช้ต้องนำมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีความกว้างของช่องขนาด 0.45 ไมครอน และต้องกำจัดฟองอากาศ (degas) ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงออกก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี่ (Lowry's method)

6.1 ลอรี่เอ (Lowry A)

ประกอบด้วย	โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
	โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
	โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในขวดวัดปริมาตร และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 5000 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

6.2 ลอรี่บี (Lowry B)

ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 50 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรจนมีปริมาตรครบ 1000 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

6.3 ลอรี่ซี (Lowry C)

ผสมลอรี่เอ 50 ส่วน ต่อลอรี่บี 1 ส่วน โดยเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.4 สารละลายโฟลิน ฟีนอลรีเอเจนต์ (folin phenol reagent)

ประกอบด้วย	โฟลิน ฟีนอลรีเอเจนต์	1	ส่วน
	น้ำกลั่น	1	ส่วน

7. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรท โดยวิธีแอนโทรน (Anthrone's method)

7.1 สารละลายกรดซัลฟุริคเข้มข้น 72% (72% sulfiric acid solution)

น้ำกลั่นปริมาตร 200 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. แช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟุริคเข้มข้นปริมาตร 750 มล. ลงไปช้าๆ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมี ปริมาตรครบ 1000 มล.

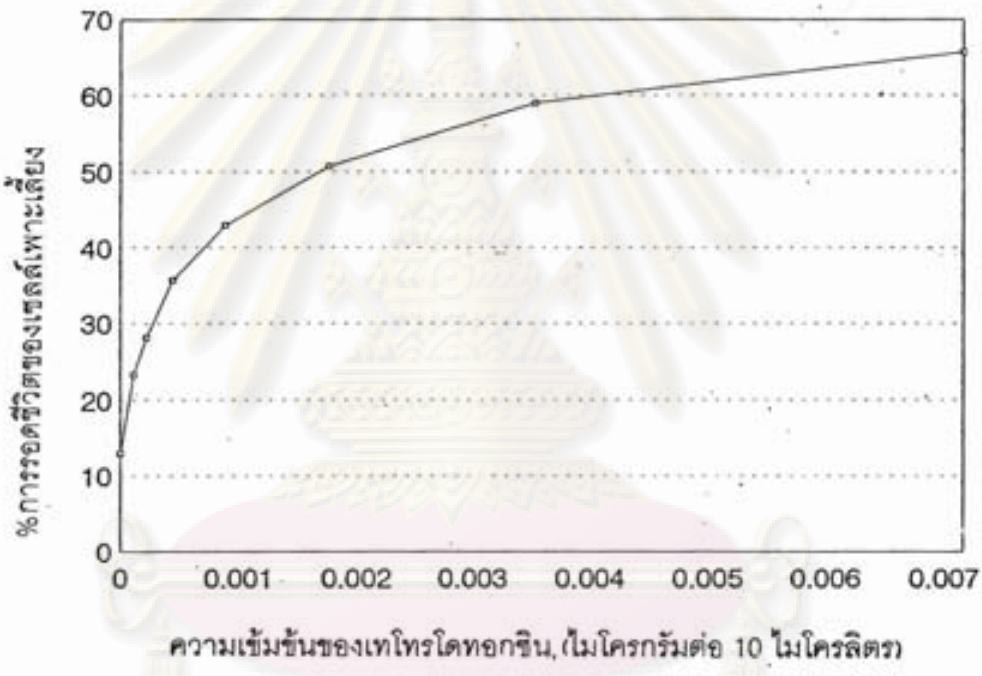
7.2 สารละลายแอนโทรนในกรดซัลฟุริค (anthrone-H_2SO_4)

ชั่งแอนโทรน ($C_{14}H_{10}O$) 0.5 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล 194.2) ละลายใน 72% กรดซัลฟุริคปริมาตร 900 มล.ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง ค่อยๆ คนจนละลายหมด จากนั้นเติมไทโอยูเรีย 1.0 กรัม คนจนละลาย ปรับปริมาตรจนครบ 1000 มล. ด้วย 72% กรดซัลฟุริค และเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ (เก็บได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

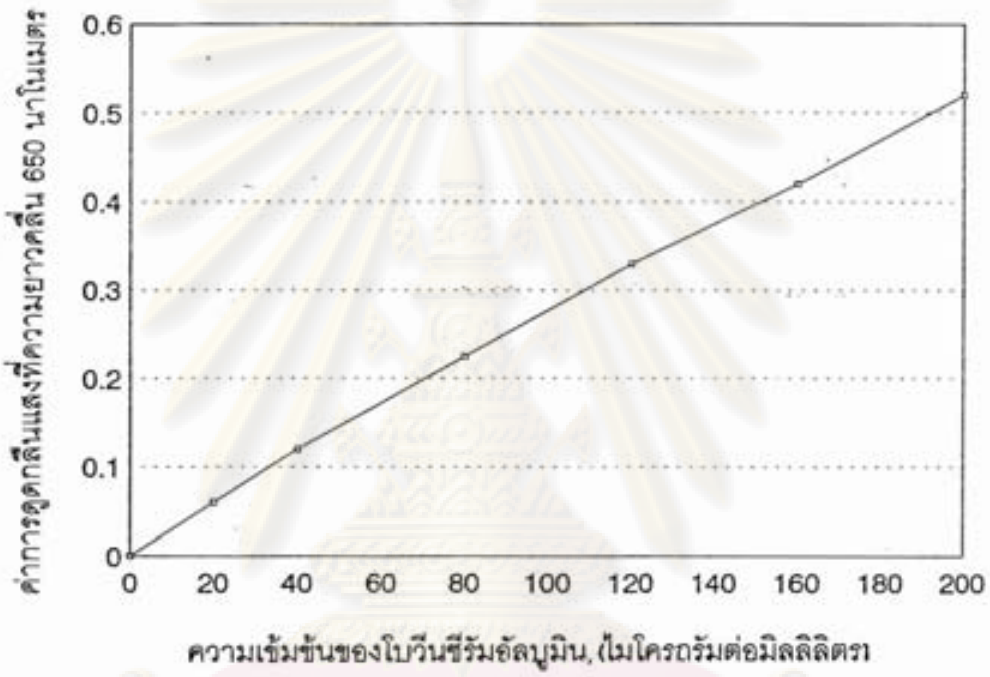
1. กราฟมาตรฐานของสารเทโทรโดทอกซินที่ใช้หาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture assay)



รูปที่ 25. กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตกับปริมาณเทโทรโดทอกซิน (ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

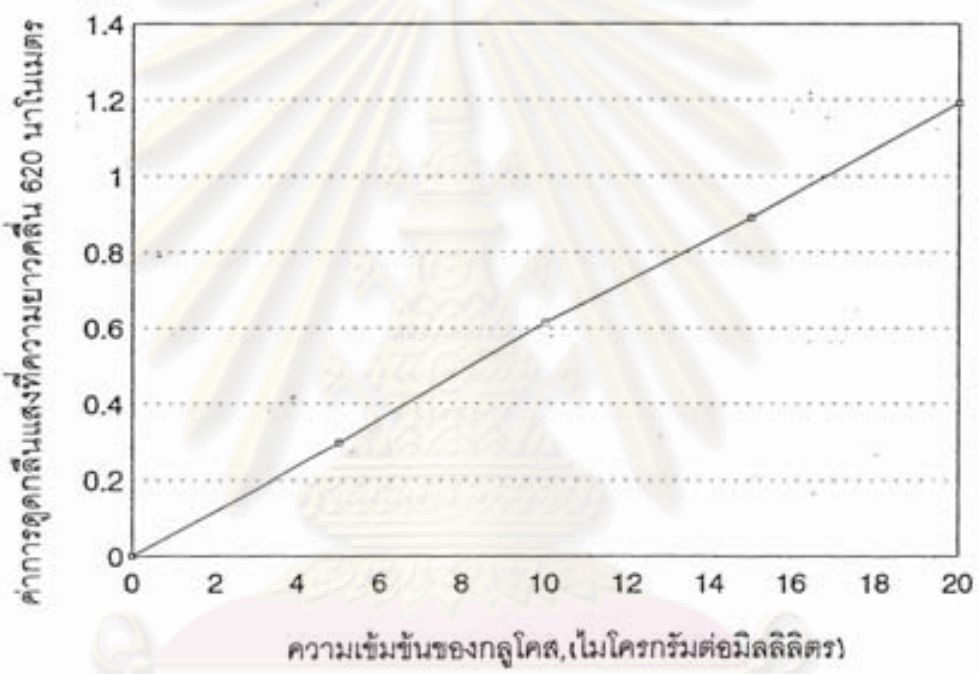
2. กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธีลอรี่ (Lowry's method)



รูปที่ 26. กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโบวีนซีรัมอัลบูมินกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีลอรี่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

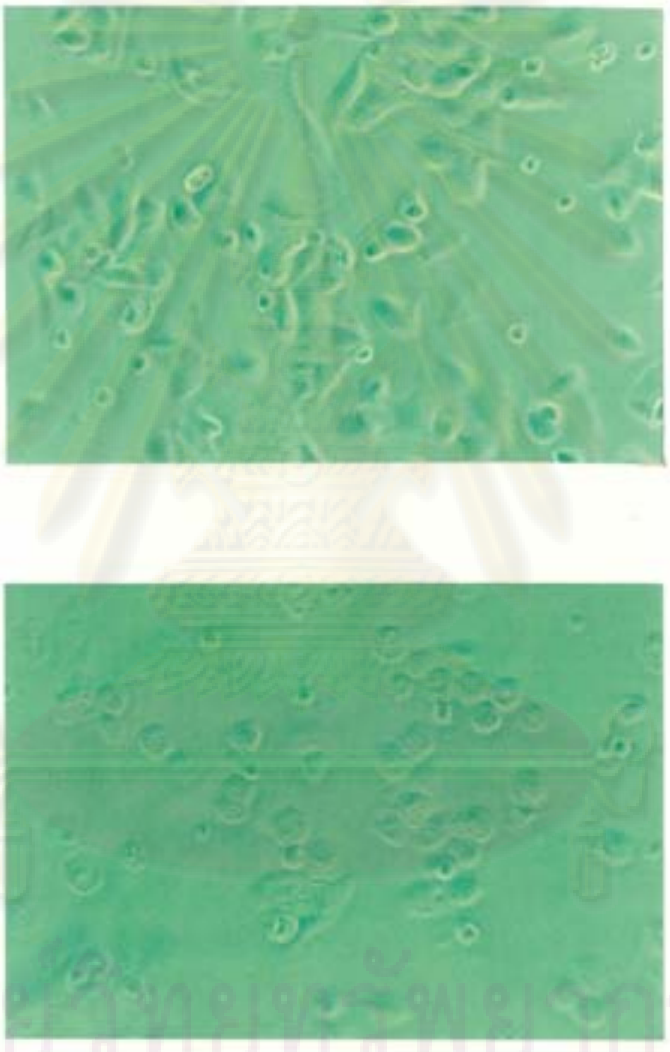
3. กราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรท โดยวิธีแอนโทรน (Anthrone method)



รูปที่ 27. กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรท โดยวิธีแอนโทรน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



(1)

(2)

รูปที่ 28 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ phase contrast กำลังขยาย 500 เท่า

(1) ลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิต

(2) ลักษณะของเซลล์ที่ตาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมบริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์

สารตัวอย่างที่สกัดได้ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหาอนุพันธุ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารพิษ โดยวิธีเอชพีแอลซี จะนำสารมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการนำมาผ่านคอลัมน์สำเร็จรูปเซพแพค ซี 18 (Sep Pak C_{18} Cartridge)

5.1 วิธีเตรียมคอลัมน์

คอลัมน์เซพแพค ซี 18 เป็นคอลัมน์สำเร็จรูปของบริษัท Water, USA. ภายในบรรจุคาร์บอน 18 ปริมาณ 360 มก. และมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1 ซม และสูง 1.2 ซม. นำคอลัมน์ดังกล่าวมาล้างด้วยแอบโซลูทเมทธานอลปริมาตรประมาณ 10 มล. และน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตรประมาณ 15 มล. ตามลำดับ

5.2 การทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์แซพแพค ซี 18

นำสารละลายของสารตัวอย่างที่สกัดได้มาผ่านคอลัมน์เซพแพคซี 18 ที่เตรียมได้ในข้อ 2.5.1 โดยให้มีอัตราการไหล (flow rate) 1.0 มล.ต่อนาที จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยกรดน้ำส้ม 0.1% ปริมาตร 20 มล. เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ส่วนประกอบและการทำงานของเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน

ส่วนประกอบของเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ชุดของวาล์ว (solenoid valves) ควบคุมการไหลของบัฟเฟอร์แต่ละชนิด

2. ปั๊มของสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer pump) ทำหน้าที่ดูดบัฟเฟอร์จากขวดผ่านวาล์วและป้องเข้าไปสู่คอลัมน์ของเรซิน เป็นปั๊มประเภท reciprocating piston

3. คอลัมน์บรรจุเรซิน(ion-exchange column, analytical column) มักเป็นคอลัมน์ 2 ชั้น ชั้นในบรรจุเรซินสำหรับแยกกรดอะมิโน ส่วนชั้นนอกจะมีน้ำไหลเวียนตลอดเวลาเพื่อควบคุมอุณหภูมิของเรซินตามที่ต้องการในช่วงเวลาหนึ่งๆ

4. ปั๊มของน้ำยานินไฮดริน(ninhydrin pump) ตัวปั๊มเหมือนกับปั๊มบัฟเฟอร์แต่ทำหน้าที่ดูดสารละลายนินไฮดรินจากขวด ซึ่งใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน

5. mixing block มีลักษณะเป็นข้อต่อ 3 ทางให้ของเหลวที่ออกจากปลายคอลัมน์ (effluent) พบกับนินไฮดรินและผสมกันก่อนที่จะไหลต่อไปยังท่อ reaction coil

6. reaction bath เป็นอ่างน้ำ หรือน้ำมันที่ถูกควบคุมให้มีอุณหภูมิสูงประมาณ 100°ซ เพื่อให้สารละลายผสมจาก mixing block ไหลมาตาม reaction coil และจุ่มอยู่ในอ่างนี้มีอุณหภูมิสูงไปด้วย ซึ่งเป็นสิ่งสำหรับการวัดกรดอะมิโนด้วยปฏิกิริยาของนินไฮดริน

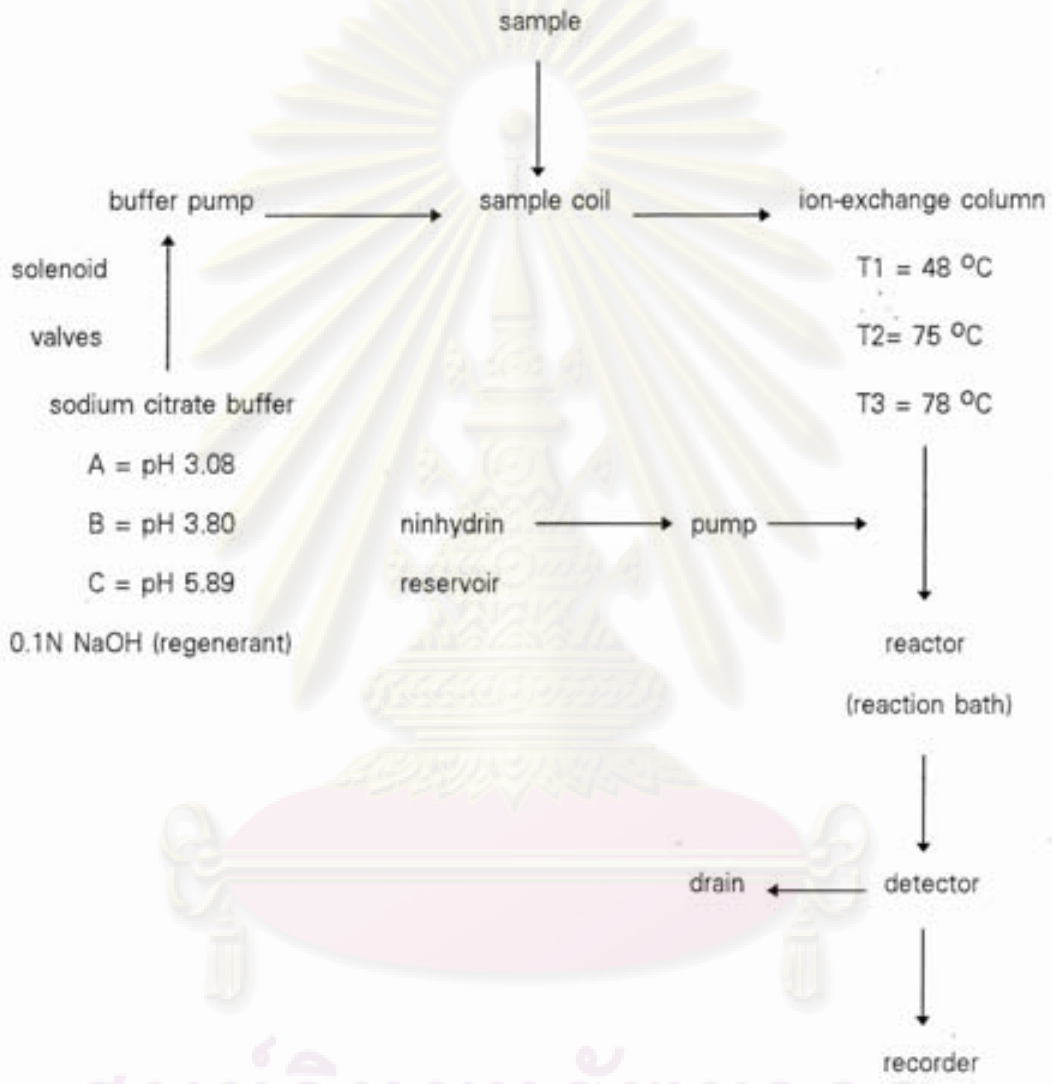
7. photometer (หรือ colorimeter)เป็น visible absorption photometer ที่วัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบอะมิโน-นินไฮดรินที่ความยาวคลื่น 570 และ 440 นาโนเมตร

8. recorder เป็นตัวบันทึกสัญญาณ absorbance หรือ transmittance ที่ส่งมาจากตัววัดของส่วน photometer ลักษณะเป็นโครมาโตแกรมแสดงการแยกของพีคและเปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้ใช้คำนวณหาปริมาณในขั้นต่อไป recorder ที่ใช้ต้องเป็น 2 channel รับสัญญาณที่วัดจากความยาวคลื่น 570 และ 440 นาโนเมตร พร้อมๆ กันไป

9. ส่วนป้อนตัวอย่างอัตโนมัติ (automatic sample loader) ทำหน้าที่ป้อนตัวอย่างแบบอัตโนมัติ เมื่อเริ่มรอบการวิเคราะห์ใหม่แต่ละครั้ง

10. programmer หรือ controllerเพื่อใช้ในการควบคุมและสั่งงานส่วนต่างๆ ให้ทำงานตามเวลาที่ต้องการ แบบระบบคอมพิวเตอร์

แผนผังของเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนดังแสดงในรูปที่ 29.



รูปที่ 29. แผนผังของเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน
(Beckman Instrument Manual, 1985)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำงานของเครื่องเริ่มต้นจากสภาวะที่คอลัมน์ได้ผ่านขั้นตอน equilibration ด้วยบัฟเฟอร์ A ในระยะเวลาเหมาะสม ตัวอย่างให้อยู่ในบัฟเฟอร์ pH 2.2-2.0 (loading buffer) เพื่อให้กรดอะมิโนทุกตัวมีประจุรวมกันเป็นบวกเพื่อช่วยให้เกิด ionic interaction ได้ดีกับ ion exchanger group ($-SO_3^-$)ของเรซิน ตัวอย่างถูกพาจาก autosampler ลงสู่คอลัมน์ จากนั้นบัฟเฟอร์แต่ละชนิดที่บรรจุไว้ในคอลัมน์และมีท่อนำให้เดินทางออกมาสู่วาล์วประจำของแต่ละบัฟเฟอร์จะผ่านเข้าปั๊มและไหลเข้าคอลัมน์พร้อมๆ กับที่อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ถูกกำหนดให้อยู่คงที่ที่อุณหภูมิหนึ่ง หรือมีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาตลอดรอบการวิเคราะห์ สารตัวสุดท้ายออกจากคอลัมน์แล้ว regenerant (0.1N NaOH) ไหลเข้ามา และตามด้วยบัฟเฟอร์ A เพื่อทำ equilibration ปั๊มของบัฟเฟอร์ทำงานดันสารละลายบัฟเฟอร์ให้ผ่านลงในคอลัมน์ผ่านไปยัง mixing block ผสมกับน้ำยานินไฮดรินเกิดปฏิกิริยาและบ่มที่ reaction coil ใน reaction bath อุณหภูมิ 100°ซ เป็นระยะเวลาหนึ่ง ก่อนเข้า photometer cell ของ colorimeter อ่านค่า absorbance ของสารละลายที่ไหลเข้า cell ถูกวัดที่ความยาวคลื่น 570 และ 440 นาโนเมตร ก่อนไหลไปขวดน้ำทิ้ง โดยสัญญาณที่วัดไว้ถูกบันทึกด้วย recorder หรือ integrator (Heftman, 1975)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. หอยสองฝา

ก. หอยทราย

Kingdom	Animalia
Sub Kingdom	Invertebrata
Phylum	Mollusca
Class	Pelecypoda
Family	Veneridae
Genus	*Asaphis*
Species	*Asaphis violascens*
ชื่อสามัญ	sand clam

หอยทรายเป็นหอยสองฝา เปลือกค่อนข้างแบน ผิวเปลือกมีลายเป็นสันถี่ และมีรอยหยักบนสัน เปลือกมีสีขาวปนม่วง (รูปที่ 7.) ขนาดที่พบตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ คือมีความกว้างประมาณ 2.5-3.5 ซม. และมีความยาว 4.0-5.5 ซม. มีการกินอาหารแบบ filter feeding หรือการกรองและพบทั่วไปตามพื้นทะเลที่เป็นทรายหรือทรายปนโคลน หอยทรายเป็นหอยที่พบว่ามีสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยพบทั้งสารกลุ่มเทโทรโดทอกซินและสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ดังนั้นจึงไม่นิยมนำมาบริโภคและพบว่าหอยทรายมีระดับความเป็นพิษไม่คงที่ในรอบปีกล่าวคือ ในระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายนมีระดับความเป็นพิษสูง ส่วนระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคมมีระดับความเป็นพิษต่ำ (Saitanu et al., 1992) พบว่าแบคทีเรียสร้างพิษในหอยทรายระยะพิษสูงมีจำนวนสูงกว่าในหอยทรายระยะพิษต่ำ (Juntongjin et al., 1994)

ข. หอยกระปุก

Kingdom	Animalia
Sub Kingdom	Invertebrata
Phylum	Mollusca
Class	Pelecypoda
Family	Veneridae

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Genus *Tapes*

Species *Tapes turgidus*

ชื่อสามัญ ridged venus clam

หอยกระปุกเป็นหอยสองฝาที่อยู่ในครอบครัวหอยลาย ส่วนเปลือกมีรูปร่างเกือบกลมป้อม ผิวเปลือกมีลายเป็นสันถี่ละเอียดและมีรอยหยักบนสัน เปลือกมักมีจุดสีดำกระจายอยู่บนพื้นเปลือกสีเหลืองอมน้ำตาล มีเอ็น (รูปที่ 8.) (ligament) ที่ยึดบานพับอยู่ภายนอก ขนาดที่พบมีความกว้างประมาณ 2.0-2.5 ซม. และมีความยาวประมาณ 3.0-3.5 ซม. และมีการกินอาหารแบบ filter feeding เหมือนหอยทราย และพบทั่วไปตามพื้นทะเลที่เป็นทรายหรือทรายปนโคลน หอยกระปุกเป็นหอยไม่มีพิษจึงนิยมนำมาบริโภค

ค. หอยรูปหัวใจ

Kingdom Animalia

Sub Kingdom Invertebrata

Phylum Mollusca

Class Pelecypoda

Family Cardiidae

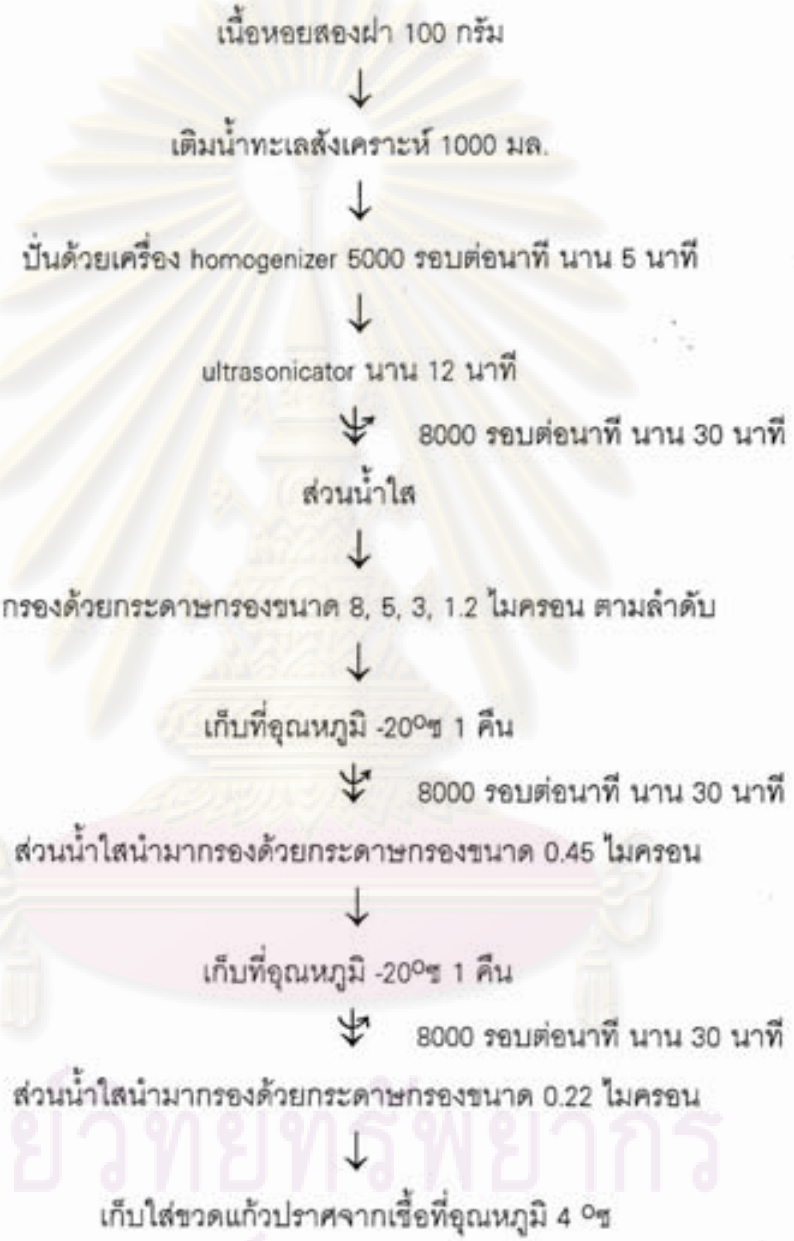
Genus *Trachycardium*

Species *Trachycardium flavum*

ชื่อสามัญ Heart clam, cockle

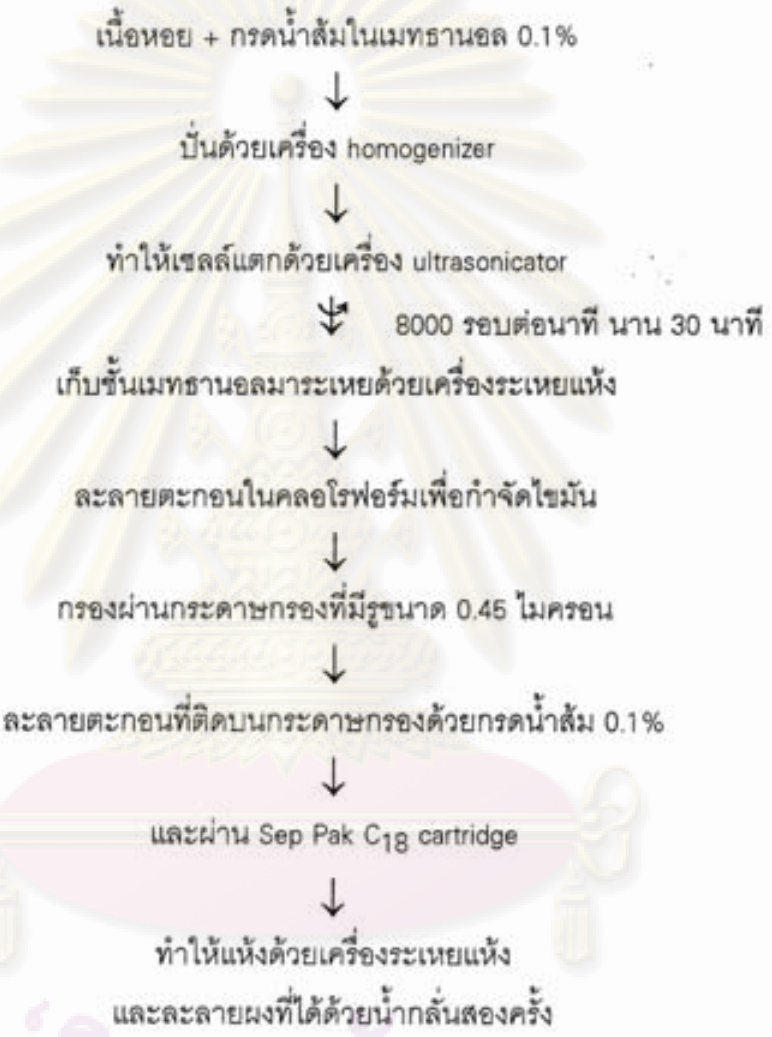
หอยรูปหัวใจเป็นสองฝาที่มีขนาดใหญ่คล้ายหอยแครงต่างกันตรงบานพับไม่มีแนวฟันยึดฝาแต่มีฟันด้านข้าง (pseudocardinal) มีรอยยึดเกาะกล้ามเนื้อ 2 แห่งขนาดเท่าๆ กัน ขอบเปลือกเบี้ยวไปทางด้านซ้าย มีส่วนยาวมากกว่าส่วนกว้าง ตัวฝาโค้งโป่งมากทั้งสองฝา ซึ่งเมื่อประกบกันมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจ ผิวเปลือกมีสันตามแนวรัศมีและมีขี่เล็กๆ ตามแนวขวางตลอดความยาวของสันดูคล้ายเป็นเกล็ดเล็กๆ ส่วนเอ็นอยู่ภายนอกมีสีเกือบดำ เปลือกมีลักษณะหยัก (ศุภผล, 2527; Abbot, 1968) ขนาดที่พบมีความกว้างประมาณ 5.5-6.5 ซม. ความยาว 5.0-6.5 ซม. (รูปที่ 9.) มีการกินอาหารแบบ filter feeding และพบทั่วไปตามพื้นทะเลที่เป็นทรายปนโคลน หอยรูปหัวใจจัดเป็นหอยไม่มีพิษจึงนิยมนำมาบริโภค

8. แผนผังแสดงวิธีการเตรียมน้ำสกัดจากหอยสองฝา



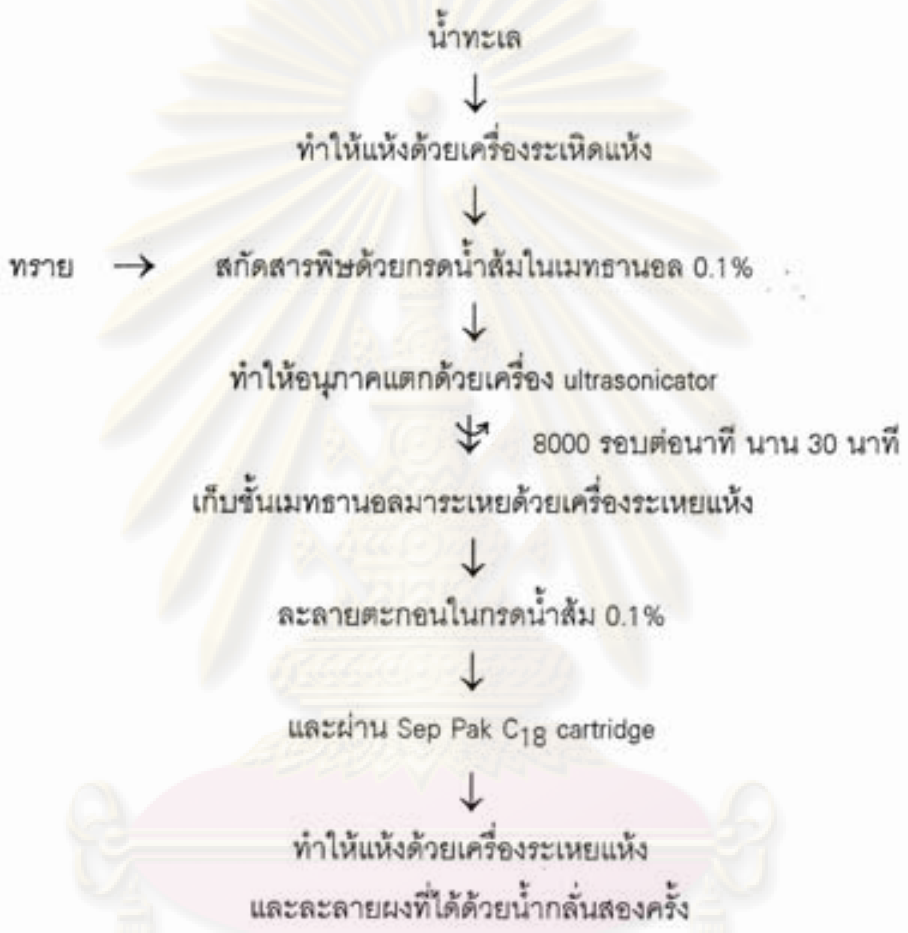
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารพิษจากเนื้อหอยสองฝา สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



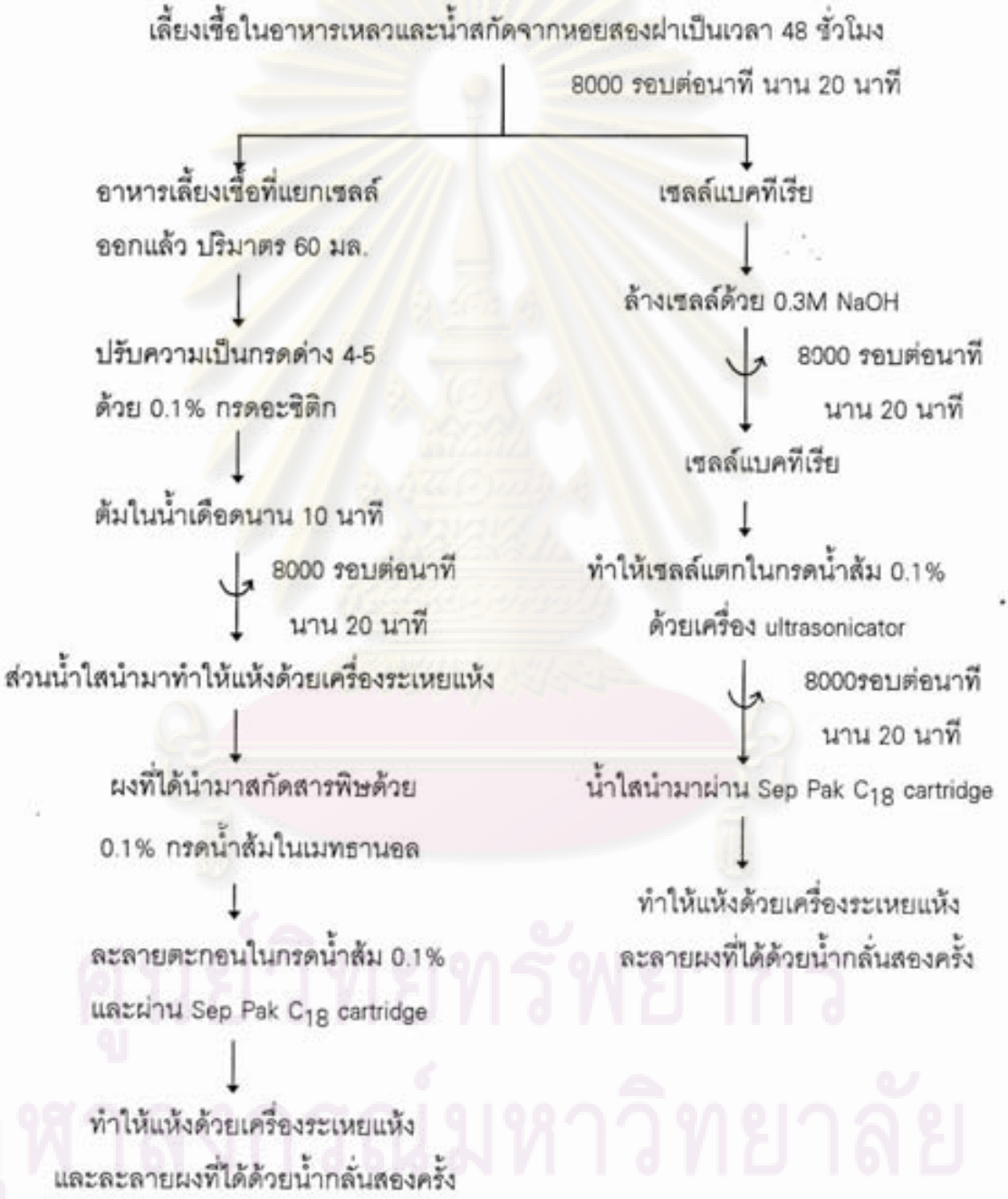
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารพิษจากสิ่งแวดล้อม สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวาง-ช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารพิษจากภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Varience, ANOVA) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบภายหลัง (Duncan's multiple range test)

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) เป็นวิธีการทางสถิติที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบเกี่ยวกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากร ในกรณีมีกลุ่มประชากรตั้งแต่สองกลุ่มขึ้นไป โดยมีตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียว เช่นต้องการเปรียบเทียบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนมีข้อตกลงเบื้องต้น (assumption) โดยข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ควรมีลักษณะตามข้อตกลงเบื้องต้นดังต่อไปนี้

1. กลุ่มตัวอย่าง เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงเป็นโค้งปกติ

2. ค่าของตัวแปรตามแต่ละหน่วยเป็นอิสระต่อกันทั้งภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่ม

- สมมุติฐาน

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3 = u_4 = u_5$

$H_1 = u_1$ อย่างน้อยหนึ่งตัวมีค่าแตกต่างจากกลุ่มอื่น

- ค่าสถิติ

$$F = \frac{\text{mean square ระหว่างกลุ่ม}}{\text{mean square ภายในกลุ่ม}} = \frac{MS_b}{MS_w} \sim F_{J-1,\, N-J}(1-\alpha)$$

เมื่อ $\frac{MS_b}{J-1} = SS_b$ และ $\frac{MS_w}{N-J} = SS_w$

J = จำนวนกลุ่ม

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$SS_b = \sum_{i=1}^{i} (n_i-1)\, S_i^2$$

$$SS_w = \sum_{i=1}^{i} n_i\, (X_i-X)^2$$

โดยพิจารณาค่า F ถ้า F มีค่าต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ถือว่าปฏิเสธ H_0 ซึ่งบอกได้ว่ามีค่าเฉลี่ยของประชากรอย่างน้อย 1 กลุ่มที่แตกต่างไปจากกลุ่มอื่นแต่ไม่ทราบว่ากลุ่มใดบ้างที่แตกต่างออกไป จำเป็นต้องใช้วิธีการเปรียบเทียบภายหลังทดสอบอีกครั้ง ในการวิจัยนี้ใช้วิธีการของ Duncan's multiple range test ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.01

Duncan's multiple range test

เป็นวิธีการทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากรว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากรคู่ใดที่แตกต่างกัน โดยใช้สูตร

$$W_p = (^{\alpha}P, n-k)\sqrt{\frac{MSE}{2}\left(\frac{n_i+n_j}{n_i n_j}\right)}$$

เมื่อ n_i, n_j = ขนาดกลุ่มประชากรที่ทำการทดลอง

P = ขั้นทดสอบที่ 2, 3, 4,..., K

ค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากรคู่ใดมีความแตกต่างมากกว่า W_p ถือว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากรคู่นั้นแตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS-PC

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นสามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติคือ SPSS-PC ได้ซึ่งสามารถกระทำได้ในระยะเวลาอันสั้น ดังมีวิธีการต่อไปนี้

```
1. title test SCB.
2. data list free/ no food SCB.
3. begin data
4. 1 1 26.1546
5. 1 2 53.3415
6. 1 3 24.1855
7. 1 4 28.5289
8. 1 5 16.7643
9. 1 1 26.9521
10. 1 2 50.5355
11. 1 3 24.8896
12. 1 4 29.0517
13. 1 5 17.0972
14. end data.
15. oneway SCB by food(1,5)/ranges duncan(.01)/stat all.
16. finish.
```

เมื่อเขียนข้อมูลและคำสั่งต่างๆได้ถูกต้องตามคู่มือการใช้โปรแกรม SPSS-PC แล้ว เครื่องคอมพิวเตอร์จะทำการประมวลผลและแสดงผลลัพธ์ตามที่ต้องการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย เกิดเมื่อวันที่ 10 มกราคม พ.ศ.2514 ที่จังหวัดปราจีนบุรีและได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ในปีการศึกษา 2534 และเข้ารับการศึกษาต่อในขั้นปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2535 ที่อยู่ปัจจุบัน 90/59 หมู่บ้านประยูรนิเวศน์ 2 ซอยลาดพร้าว 41 ถนนลาดพร้าว แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย