บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทะเล *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 และการสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อ

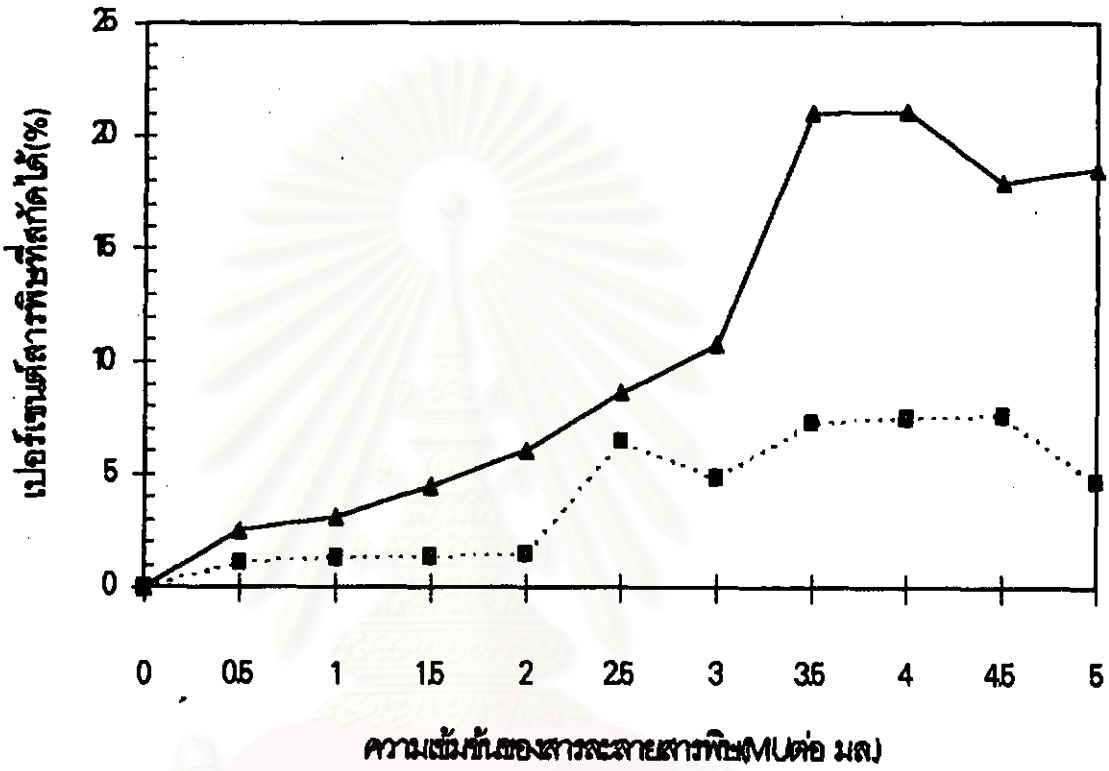
จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีในหน้า 27 รวมทั้งตรวจสอบปริมาณสารพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามวิธีในหน้า 29 พบว่า สารพิษที่สกัดจากภายในเซลล์มีความเป็นพิษรวม 13.3234 MUต่อลิตร มีความเป็นพิษจำเพาะ 0.0096 MUต่อมก. และสารพิษที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษรวม 227.2090 MUต่อลิตร ความเป็นพิษจำเพาะ 0.0125 MUต่อมก.

2. การหาวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์

แบบที่ 1 การใช้เทคนิคการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์และเจลฟิลเตรชั่น

การหาผงถ่านกัมมันต์ชนิดที่เหมาะสมในการดูดซับสารพิษที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1

เปรียบเทียบความสามารถในการดูดซับสารพิษของ ผงถ่านกัมมันต์ 2 ชนิด คือ ผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Sigma chemical, USA. และผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Riedel-de Haen, Germany. โดยเตรียมสารละลายสารพิษผสมของสารที่สกัดจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5จนถึง 5.0 MUต่อมล. ทำการสกัดตามวิธีในข้อ 2 หน้า 32 นำสารพิษที่สกัดได้นำไปตรวจหาปริมาณสารพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสามารถขะสารพิษออกจากผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Sigma ได้ปริมาณมากกว่าการใช้ผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Riedel-de Haen ทุกความเข้มข้นของสารพิษตั้งต้น ดังผลการทดลองในรูปที่ 4. ดังนั้นจึงเลือกใช้ผงถ่านกัมมันต์ ของ Sigma ในงานวิจัยขั้นต่อไป



รูปที่ 4. เปอร์เซนต์สารพิษที่สกัดได้จากการใช้ผงถ่านกัมมันต์ 2 ชนิดในการดูดซับสารพิษในสารละลายความเข้มข้นต่างๆ

—▲— สารพิษรวมที่สกัดได้จากการใช้ ผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Sigma

····■···· สารพิษรวมที่สกัดได้จากการใช้ ผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Riedel-de Haen

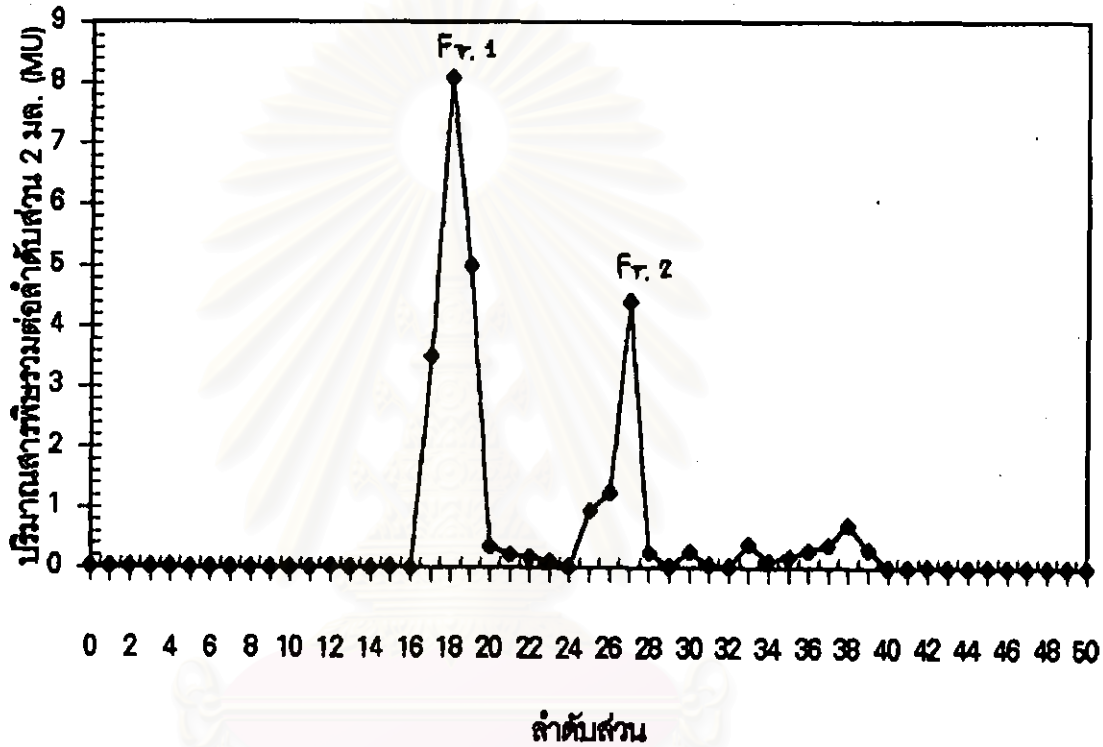
การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ของ Sigma

จากผลการทดลองหาชนิดของผงถ่านกัมมันต์ที่เหมาะสมมีการใช้ปริมาณผงถ่านกัมมันต์เป็น 10 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารพิษ พบว่าสามารถสกัดสารพิษได้สูงสุดประมาณ 21 เปอร์เซนต์ ที่ความเข้มข้นของสารพิษตั้งต้น 4 MUต่อมล. ดังนั้นจึงทดลองใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการดูดซับสารพิษจากเซลและอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ต่อสารพิษเป็น 1 ต่อ 2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อให้ได้สารสกัดสารพิษเพิ่มขึ้น โดยใช้ปริมาณสารพิษตั้งต้นรวม 76.0402 MU (16.7288 µg.) มีความเป็นพิษจำเพาะ 0.0080 MUต่อมก. เตรียมสารพิษให้มีความเข้มข้น 4.0 MUต่อมล. นำสารพิษมาดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ ตามวิธีในข้อ 2 หน้า 33 และหาปริมาณสารพิษที่สกัดได้โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ปริมาณสารพิษรวม 63.9814 MU (14.0759 µg.) มีสารพิษเหลืออยู่ 84.08 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.68 เท่า

การใช้โครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี - 2 (Bio - Gel P - 2 chromatography)

เป็นการทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการแยกสารตามความแตกต่างของขนาด จากการนำสารพิษที่ผ่านการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ไปทำให้แห้งและละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 4 มล.ไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. นำแต่ละลำดับส่วนไปทำให้แห้งและหาปริมาณสารพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ผลดังรูปที่ 5 . ซึ่งพบว่าสารพิษถูกชะออกมาที่ลำดับส่วนที่ 17--19 และลำดับส่วนที่ 25-28 เมื่อรวมลำดับส่วนที่ 17-19 เข้าด้วยกัน ได้ความเป็นพิษรวม 16.6000 MU มีความเป็นพิษจำเพาะ 0.1726 MUต่อมก.มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 21.58 เท่า เหลือความเป็นพิษอยู่ 21.83 เปอร์เซนต์ ส่วนในลำดับส่วนที่ 25-28 มีความเป็นพิษรวม 6.6026 MU เหลือความเป็นพิษ 8.68 เปอร์เซนต์ ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.33 เท่า สรุปขั้นตอนต่างๆในการทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์ตามวิธีแบบที่ 1 แสดงในตารางที่ 3.

เมื่อนำสารพิษจากลำดับส่วนที่ 17-19 และลำดับส่วนที่ 25-28 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิสทั้งสองระบบอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมตามวิธีในหน้า 35 ไม่พบการเรืองแสงของสารจากทั้งสองส่วนในการวิเคราะห์ด้วยระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ดังรูปที่ 6 แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยพบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารจากลำดับส่วนที่ 17-19 พบแถบเรืองแสงมีระยะไกล้เคียงกับสารมาตรฐานอนุพันธ์ GTX4 และ GTX2 ดังรูปที่ 7.



รูปที่5. ปริมาณสารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล.จากการทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอเจล พี - 2 (วิธีแบบที่ 1) คอลัมน์ขนาด1.5x30 ซม. ชะสารพิษด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 15 มล.ต่อชม. เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ดังอธิบายในบทที่ 3 หน้า 33

Fr. 1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 17-19

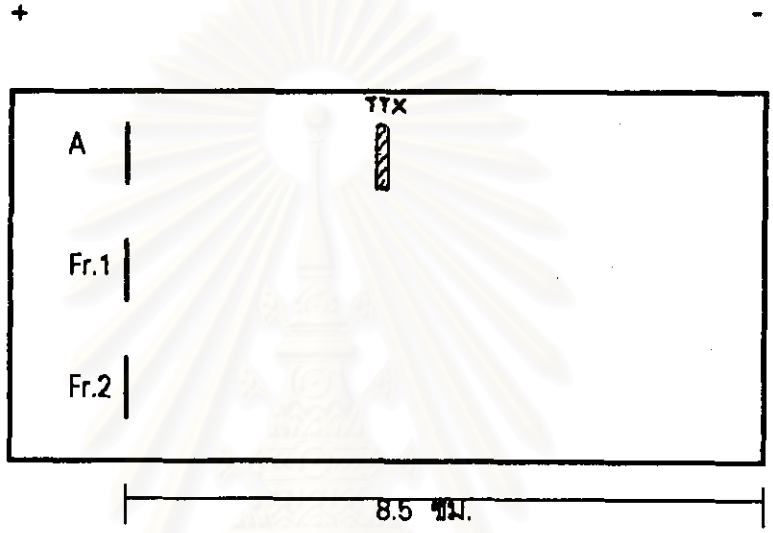
Fr. 2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 25-28

ตารางที่ 3. สรุปผลการทำให้สารกึ่งขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์ตามวิธีแบบที่ 1.

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	ความเป็นพิษทั้งหมด(MU)	น้ำหนักแห้ง(มก.)	ความเป็นพิษจำเพาะ (MU/มก.)	เปอร์เซนต์ความเป็นพิษ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
1.สารพิษสกัดจากเซลและอาหารเลี้ยงเชื้อ	20	76.0402	9488.5	0.0080	100.00	1.0
2.สารพิษหลังการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์	170	63.9314	4771.0	0.0134	84.08	1.7
3.สารพิษหลังไบโอเจล พี-2	6	16.6000	96.2	0.1726	21.83	21.6
*ลำดับส่วนที่ให้ความเป็นพิษสูงสุด	2	8.1900	36.87	0.2221	10.77	27.8

* คือ ลำดับส่วนหนึ่งในลำดับส่วนที่พบความเป็นพิษขั้นสารพิษหลังไบโอเจล พี-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



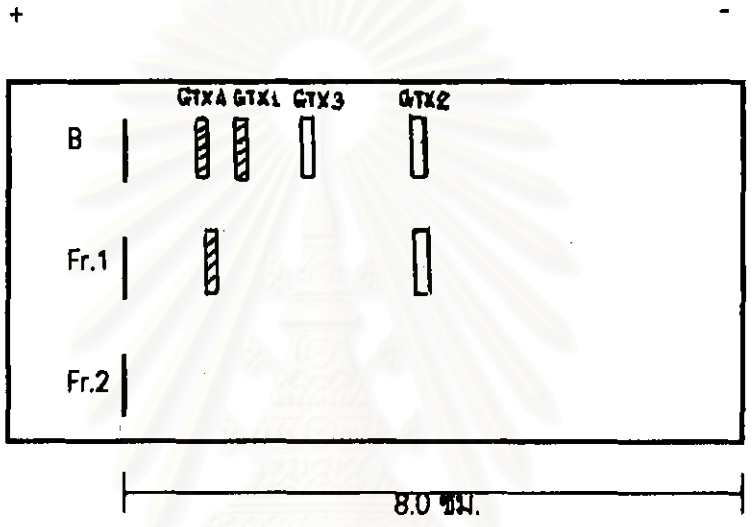
รูปที่ 6 การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมจากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 1)โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

A คือ สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน (TTX)

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 17-19

Fr.2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 25-28

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง



รูปที่ 7. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึ่งวางช่องโซเดียมจากคอลัมน์ใบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 1) โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

B คือ สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน (GTX1-4)

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 17-19

Fr.2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 25-28

▨ คือการเรืองแสงสีเขียวเหลือง

▭ คือการเรืองแสงสีฟ้า

แบบที่2 การใช้เทคนิคเจลฟิลเตรชันและแลกเปลี่ยนอิออน

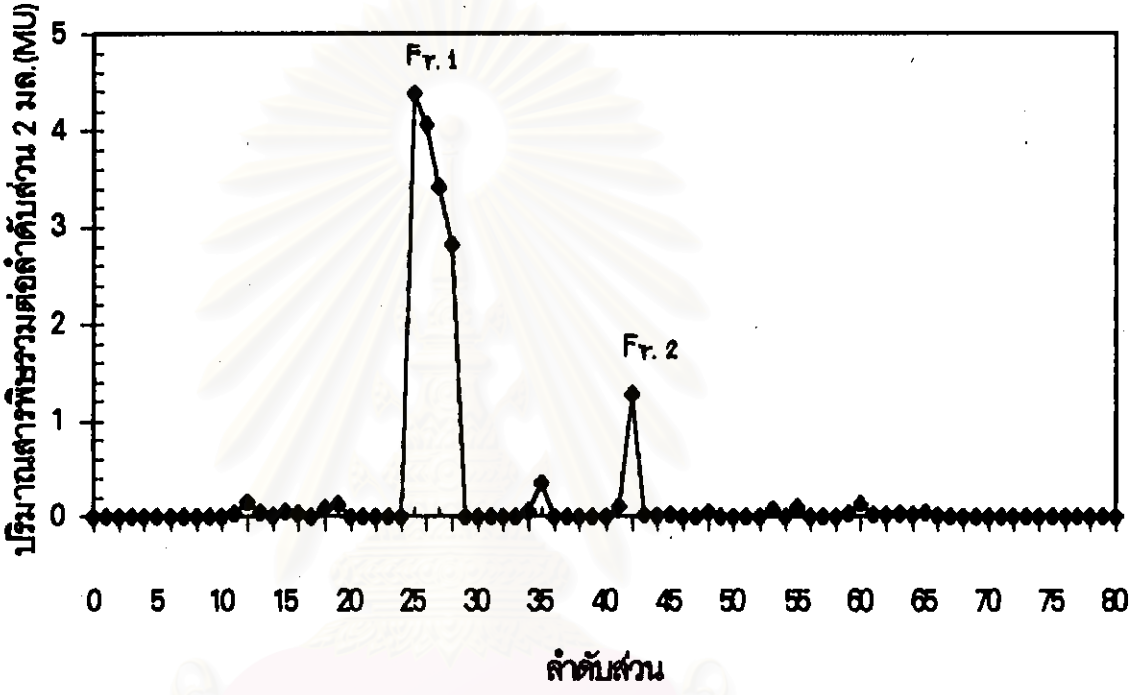
การใช้คอลัมน์ไบโอเจล พี - 2 โครมาโตกราฟี

สารสกัดจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ปริมาณ 27.1335 MU มีความเป็นพิษจำเพาะ 0.0075 MUต่อมก. ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 7 มล. นำไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี - 2 เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ดังวิธีการในข้อ 4 หน้า 33 ได้ผลดังรูปที่ 8. พบว่าสารพิษถูกชะออกมาที่ลำดับส่วนที่ 25-28 และที่ลำดับส่วนที่ 42 ความเป็นพิษจำเพาะและเปอร์เซนต์ความเป็นพิษที่เหลือในแต่ละลำดับส่วนแสดงในตารางที่ 4.

ตารางที่4.ผลการทำให้สารกึ่งบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ไบโอเจลพี2(ตามแบบที่ 2)

ลำดับส่วนที่	ความเป็นพิษทั้งหมด(MU)	ความเป็นพิษจำเพาะ (MU/มก.)	เปอร์เซนต์ความเป็นพิษ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
25 - 28	14.6805	0.0369	54.10	4.9
42	1.2816	0.0360	4.72	4.8

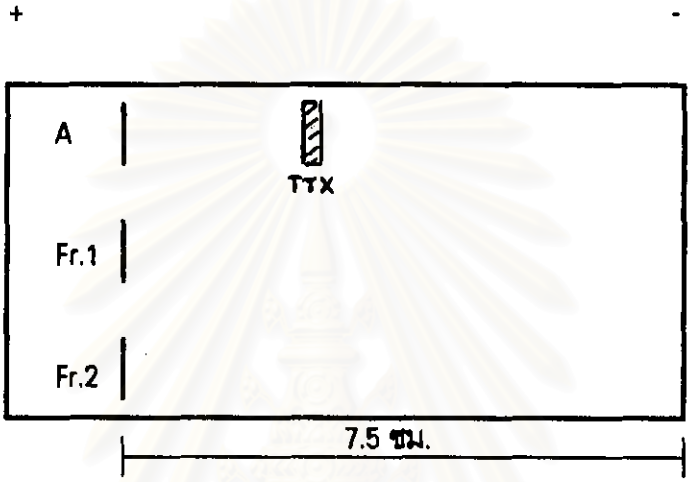
เมื่อนำสารพิษจากทั้งสองส่วนคือลำดับส่วนที่ 25-28 และลำดับส่วนที่ 42 ไปวิเคราะห์โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิสทั้งสองระบบอนุพันธ์ พบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซิน ไม่เกิดการเรืองแสงจากสารทั้งสองส่วน ดังรูปที่ 9 แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบอนุพันธ์กลุ่มพิษอัมพาตจากหอยพบการเรืองแสงของสารจากลำดับส่วนที่ 25-28 มีระยะใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอนุพันธ์ GTX4 และ GTX2 ดังรูปที่ 10.



รูปที่ 8. ปริมาณสารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล.จากการทำสารกึ่งขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์ โดยคอลัมน์โมโอเจล พี - 2 (วิธีแบบที่ 2) คอลัมน์ขนาด1.5x50 ซม. บรรจุเจลสูง 44 ซม. ชะสารพิษด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 15 มล.ต่อซม. เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ดังอธิบายในบทที่ 3 หน้า 33

Fr. 1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 25-28

Fr. 2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 42



รูปที่ 9. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึ่งขวางช่องโซเดียมจากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 2)โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

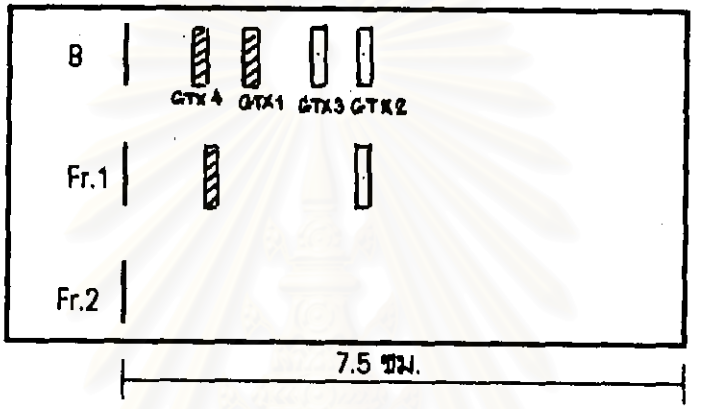
A คือ สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 25-28

Fr.2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 42

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารที่ตกค้างช่องโซเดียมจากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 2)โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

B คือ สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน (GTX1-4)

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 25-28

Fr.2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 42

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

▭ คือ การเรืองแสงสีฟ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

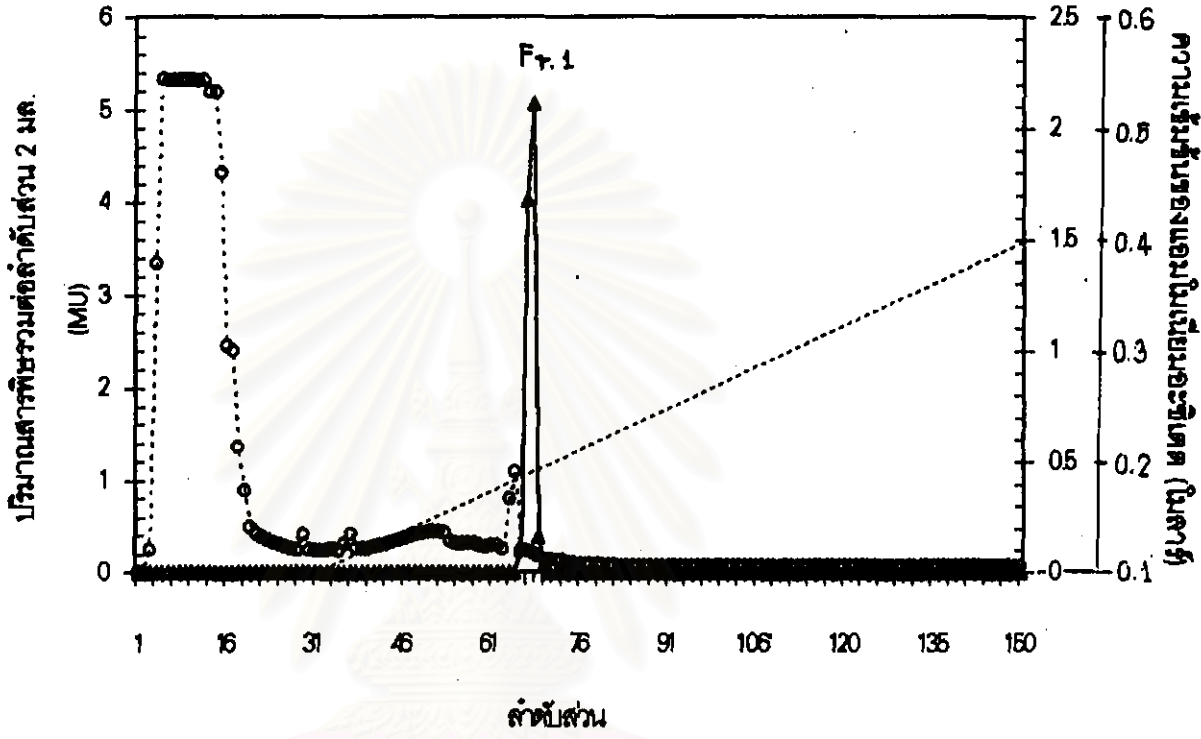
การใช้คอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (CM - Sephadex C - 25)

นำสารพิษที่ได้จากคอลัมน์ไบโอเจล พี-2 ลำดับส่วนที่ 25-28 ปริมาณ 14.6805 MU (398.3 มก.)ละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มล. นำไปผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคบวก (cation exchanger) ดังวิธีการในบทที่ 3 หน้า 34 สารพิษจะจับกับตัวกลางนี้ ดังนั้นขั้นตอนนี้สามารถกำจัดโปรตีนหรือสารอื่นที่มีประจุตรงข้ามกับสารพิษได้ และยังสามารถแยกสารที่มีประจุต่างกับสารพิษมากๆโดยการชะด้วยเกรเดียนท์ของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 0.1-0.4 โมลาร์ ผลการทดลองดังรูปที่ 11 พบว่าสารพิษถูกชะออกมาที่ลำดับส่วนที่ 66-69 ซึ่งมีความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตประมาณ 0.15-0.20 โมลาร์ เมื่อรวมลำดับส่วนที่ 66-69 เข้าด้วยกัน นำไปทำให้แห้งด้วยวิธีระเหิดแห้ง และตรวจหาความเป็นพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความบริสุทธิ์และเปอร์เซนต์ความเป็นพิษที่เหลือแสดงในตารางที่ 5. สรุปขั้นตอนต่างๆในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์ตามวิธีแบบที่ 2 แสดงดังตารางที่ 6.

ตารางที่ 5. ผลการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (ตามแบบที่ 2)

ลำดับส่วนที่	ความเป็นพิษทั้งหมด(MU)	ความเป็นพิษจำเพาะ (MU/มก.)	เปอร์เซนต์ความเป็นพิษ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
66-69	9.7320	0.4915	35.87	65.5

เมื่อนำสารพิษจากลำดับส่วนที่ 66-69 ไปวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิสทั้งสองระบบ ไม่พบการเรืองแสงของสารเมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ดังรูปที่12 แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยพบแถบเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ระยะใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอนุพันธ์ GTX4 และ GTX3 ดังรูปที่ 13



รูปที่ 11. ปริมาณสารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล. ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของแอมโมเนียมอะซิเตดจากการทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (วิธีแบบที่ 2) คอลัมน์ขนาด1.5x20 ซม. บรรจุเจลสูง 18 ซม. ชะสารพิษด้วยเกรเดียนท์ของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดที่ความเข้มข้น 0.1-0.4 โมลาร์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ด้วยอัตราการไหล 20 มล.ต่อชม. เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ดังอธิบายในบทที่ 3 หน้า 34

—▲— สารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล.(MU)

.....o..... การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

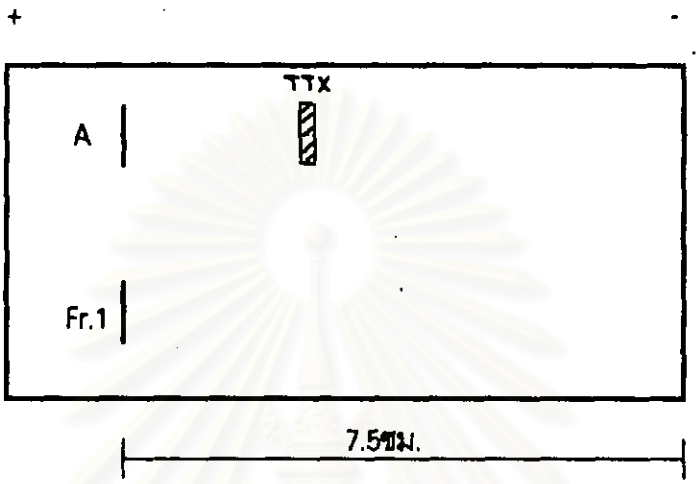
..... ความเข้มข้นของแอมโมเนียมอะซิเตด (โมลาร์)

ตารางที่ 6. สรุปผลการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์ตามวิธีแบบที่ 2

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	ความเป็นพิษทั้งหมด(MU)	น้ำหนักแห้ง(มก.)	ความเป็นพิษจำเพาะ (MU/มก.)	เปอร์เซนต์ความเป็นพิษ(%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
1.สารพิษสกัดจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ	10	27.1335	3617.8	0.0075	100	1.0
2.สารพิษหลังไบโอเจล พี-2	8	14.6805	398.3	0.0369	54.10	4.9
3.สารพิษหลังซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี-25	6	9.7320	19.8	0.4915	35.87	65.5
*ลำดับส่วนที่มีความเป็นพิษสูงที่สุด	2	5.0670	8.5	0.5961	18.67	79.5

* คือลำดับส่วนหนึ่งในลำดับส่วนที่พบความเป็นพิษขั้นสารพิษหลังซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



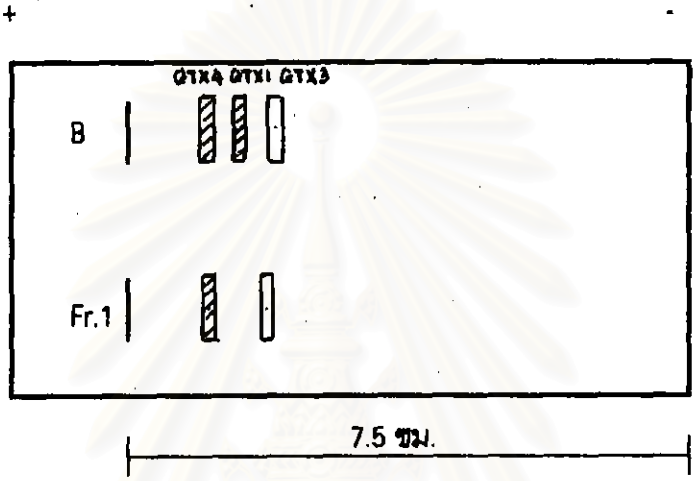
รูปที่ 12 การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึ่งขวางช่องโซเดียมจากคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

A คือ สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 66-69

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมจากคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

B คือ สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน (GTX1-4)

Fr.1คือ สารจากลำดับส่วนที่ 66-69

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

▭ คือ การเรืองแสงสีฟ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองเปรียบเทียบวิธีการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์ทั้งสองแบบคือ แบบที่ 1 การดูดซับด้วยผงถ่านเร่งและโครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี 2 และแบบที่ 2 การโครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี 2และโครมาโตกราฟีบนซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 เห็นได้ว่าแต่ละขั้นตอนมีส่วนในการทำให้สารมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น คือการนำสารพิษไปผ่านการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ก่อนการนำไปโครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี 2 จะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์กว่าการนำสารสกัดสารพิษไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 โดยตรงถึงประมาณ 16.7 เท่า และไม่สูญเสียปริมาณสารพิษในขั้นตอนนี้มากนัก รวมทั้งการใช้เทคนิคการแลกเปลี่ยนอิออนโดยคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 ต่อจากการใช้เทคนิคการแยกสารตามขนาดโดยคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 จะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารอีกประมาณ 60 เท่า ดังนั้นจึงรวมเทคนิคต่างๆทั้ง 3ขั้นตอนมาใช้ในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากเซลล์แบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 มีความบริสุทธิ์

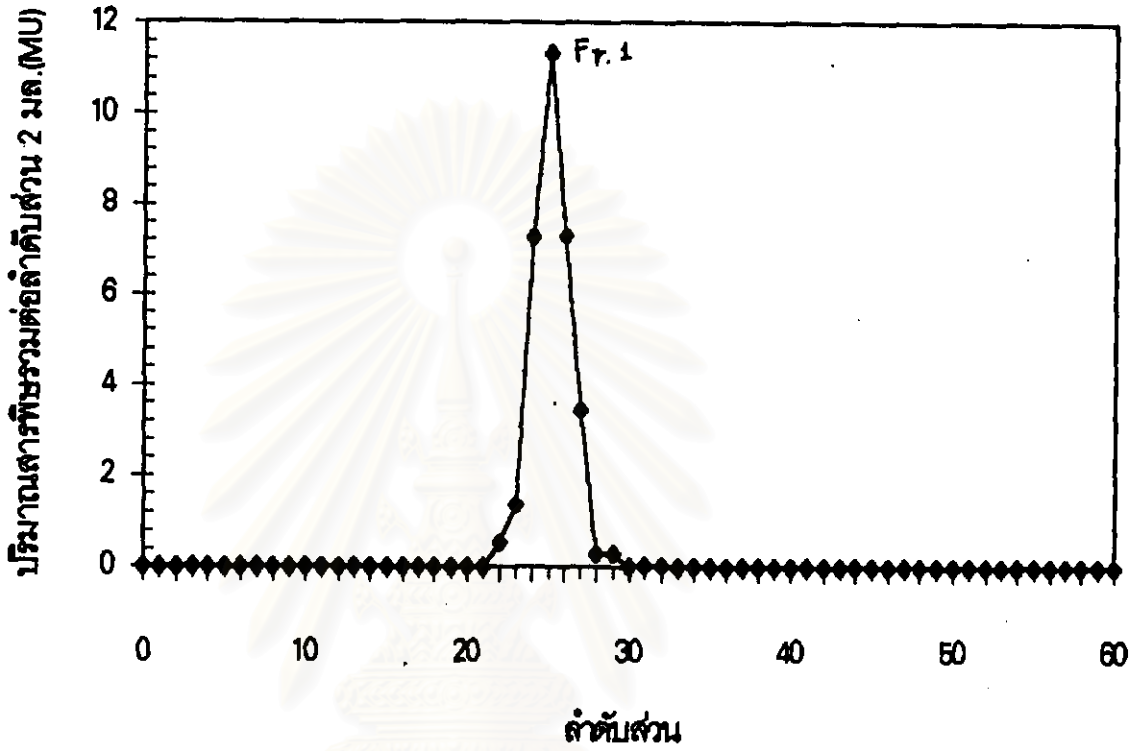
การดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์

นำสารพิษที่สกัดจากเซลล์ตามวิธีในบทที่ 3 หน้า 28 ปริมาณ 59.1745 MU (6164.0 มก.) มาดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์และทำการสกัดตามวิธีในหน้า 33 หลังจากใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหาปริมาณสารพิษ พบว่ามีปริมาณสารพิษรวม 41.0849 MU ความเป็นพิษจำเพาะ 0.0167 MUต่อมก. ปริมาณสารพิษเหลืออยู่ 69.43 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.7 เท่าเมื่อเทียบกับสารสกัดสารพิษจากเซลล์เริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 7.

การใช้โครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี 2

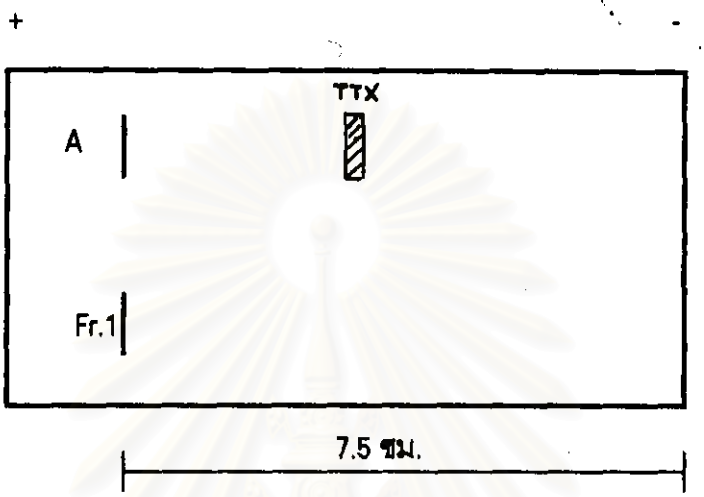
นำสารพิษที่สกัดจากผงถ่านกัมมันต์ปริมาณ 41.0849 MU (2460.6 มก.) ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 7 มล. มาผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ตามวิธีในบทที่ 3 หน้า 33 นำแต่ละลำดับส่วนไปหาปริมาณสารพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ผลดังรูปที่ 14 ซึ่งพบสารพิษออกมาที่ลำดับส่วนที่ 22-29 เมื่อรวมลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกันได้ความเป็นพิษรวม 31.8808 MU ความเป็นพิษจำเพาะ 0.0928 MUต่อมก. มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.7 เท่า ยังคงเหลือปริมาณสารพิษ 53.88 เปอร์เซนต์ เมื่อนำสารพิษจากลำดับส่วนที่ 22-29 นี้ไปวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ด้วยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิส ได้ผลดังรูปที่ 15 และ 16 พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอนุพันธ์GTX4 และที่ตำแหน่งการเคลื่อนที่ได้มากกว่า GTX3 เมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบพิษอัมพาตจากหอย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่14. ปริมาณสารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล. จากการทำสารกึดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอเจล พี- 2 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. บรรจุเจลสูง 44 ซม. ชะสารพิษด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 15 มล.ต่อชม. เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ดังอธิบายในบทที่ 3 หน้า 33

Fr. 1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 22-29



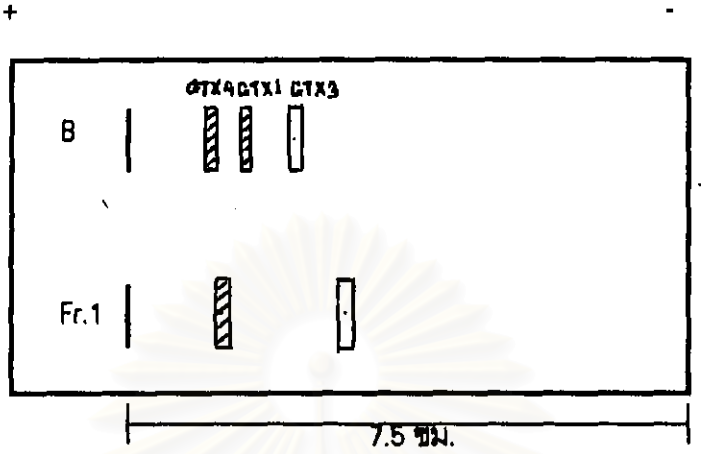
รูปที่ 15 การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึ่งกลางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ ผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

A คือ สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 22-29

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึ่งขวางช่องโซเดียมสกัดจากเซลล์ผ่านคอลัมน์ใบโอเจล พี-2โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

B คือ สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน (GTX1-4)

Fr.1คือ สารจากลำดับส่วนที่ 22-29

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

▭ คือ การเรืองแสงสีฟ้า

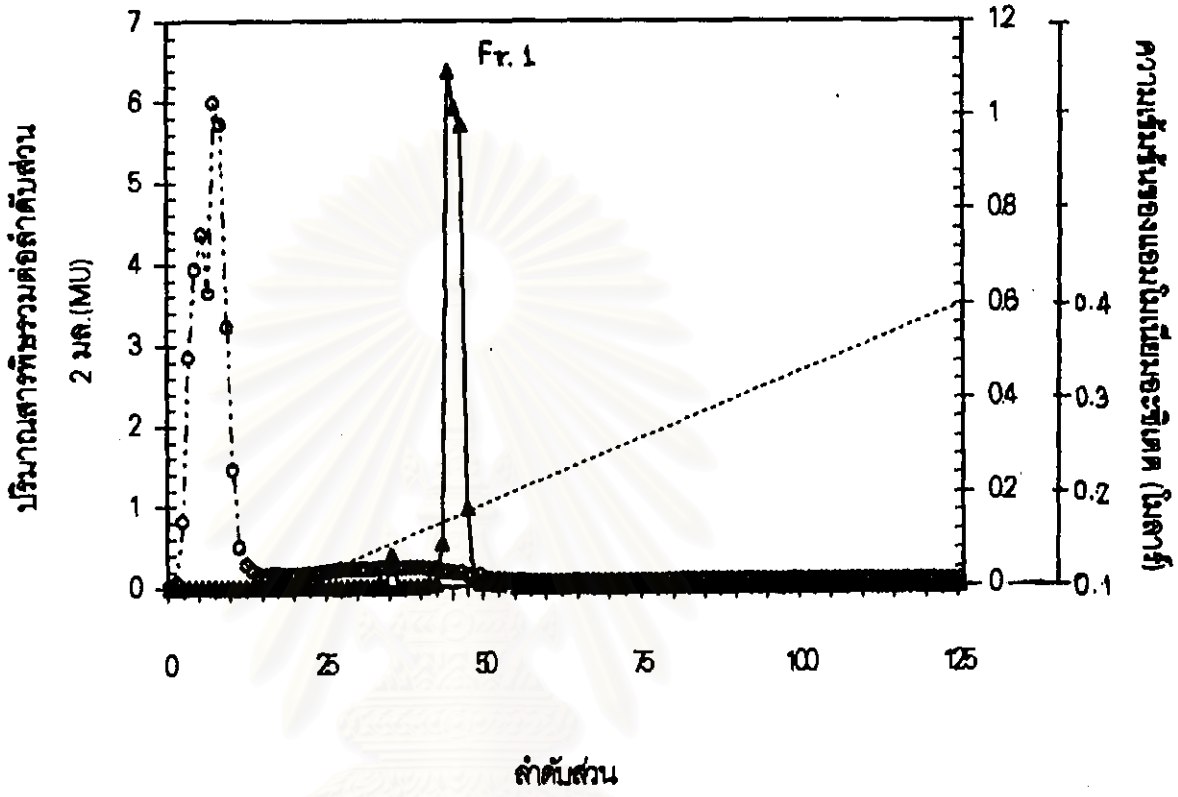
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การใช้โครมาโตกราฟีบนซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี 25

นำสารพิษที่ผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ปริมาณ 31.8808 (343.4 มก.)มาละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 ปริมาตร 1 มล. ผ่านคอลัมน์ซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี 25 เก็บลำดับส่วน 2 มล. ตามวิธีในบทที่ 3 หน้า 34 นำแต่ละลำดับส่วนไปหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ผลดังรูปที่ 17 พบว่าสารพิษถูกชะออกมาที่ลำดับส่วนที่ 43-47 ที่ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดประมาณ 0.15-0.18 โมลาร์ เมื่อรวมลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกันไปปริมาณสารพิษรวม 19.4040 MU ความเป็นพิษจำเพาะ 0.3827 MUต่อมก. มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 39.9 เท่า คงเหลือความเป็นพิษ 32.79 เปอร์เซนต์ สรุปขั้นตอนในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ St-1-1 ให้มีความบริสุทธิ์ ดังตารางที่ 7

เมื่อนำสารพิษที่ได้จากลำดับส่วน 43-47 ไปวิเคราะห์โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิสทั้งสองกลุ่ม พบว่าสารพิษให้แถบเรืองแสงที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอนุพันธ์ GTX4 เมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบของอนุพันธ์กลุ่มพิษอัมพาตจากหอย แต่ไม่พบการเรืองแสงเมื่อวิเคราะห์ด้วยกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (รูปที่ 18, 19)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่17. ปริมาณสารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล.ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของแอมโมเนียมอะซิเตดจากการทำสารกีดขวางช่องโซเดียมจากสารสกัดจากเซลล์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 ซม. บรรจุเจลสูง 18 ซม. ชะสารพิษด้วยเกรเดียนท์ของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดที่ความเข้มข้น 0.1-0.4 โมลาร์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ด้วยอัตราการไหล 20 มล.ต่อชม. เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ดังอธิบายในบทที่ 3 หน้า 34

—▲— สารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล.(MU)

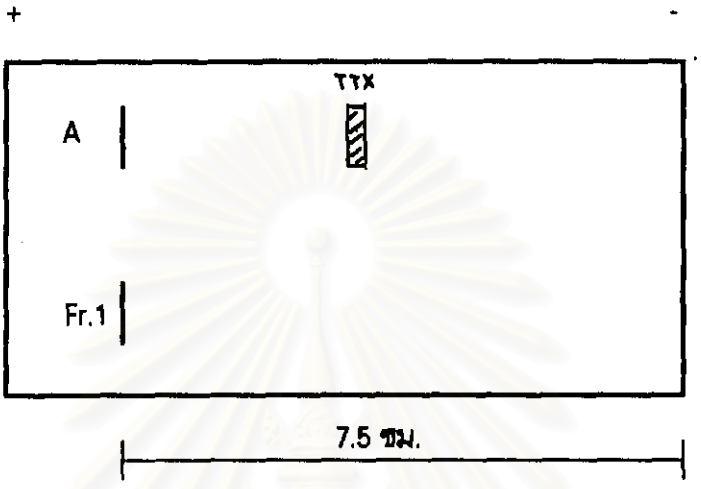
----o----- การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

..... ความเข้มข้นของแอมโมเนียมอะซิเตด (โมลาร์)

ตารางที่ 7. สรุปผลในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 มีความบริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	ความเป็นพิษทั้งหมด(MU)	น้ำหนักแห้ง(มก.)	ความเป็นพิษจำเพาะ (MU/มก.)	เปอร์เซนต์ความเป็นพิษ(%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
1.สารพิษสกัดจากเซลล์	15	59.1745	6164.0	0.0096	100	1.0
2.สารพิษหลังการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์	80	41.0849	2460.6	0.0167	69.43	1.7
2.สารพิษหลังไบโอเจล พี-2	16	31.8808	343.4	0.0928	53.88	9.7
3.สารพิษหลังซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี-25	10	19.5040	50.7	0.3847	32.96	40.1
*ลำดับส่วนที่มีความเป็นพิษสูงที่สุด	2	6.3900	10.65	0.6000	10.80	62.5

* คือ ลำดับส่วนหนึ่งในลำดับส่วนที่พบความเป็นพิษขั้นสารพิษหลังซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25



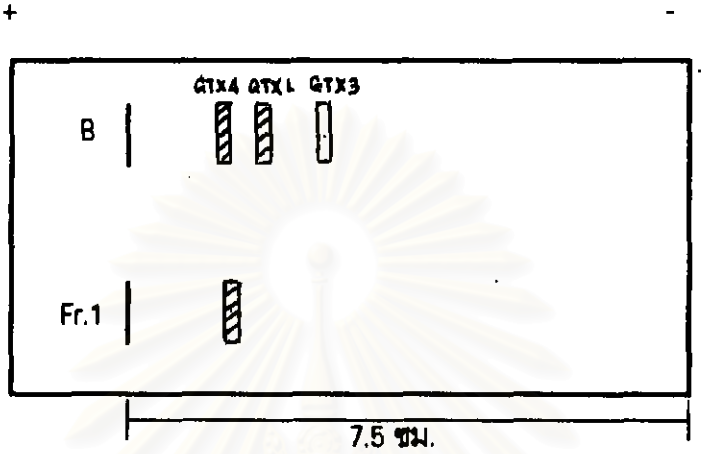
รูปที่ 18. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึ่งขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ ผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

A คือ สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 43-47

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19.การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึ่งขวางช่องโซเดียมสกัดจากเซลล์ ผ่านคอลัมน์ซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม พิษอัมพาตจากหอย ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

B คือ สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน (GTX1-4)

Fr.1คือ สารจากลำดับส่วนที่ 43-47

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

▭ คือ การเรืองแสงสีฟ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 มีความบริสุทธิ์

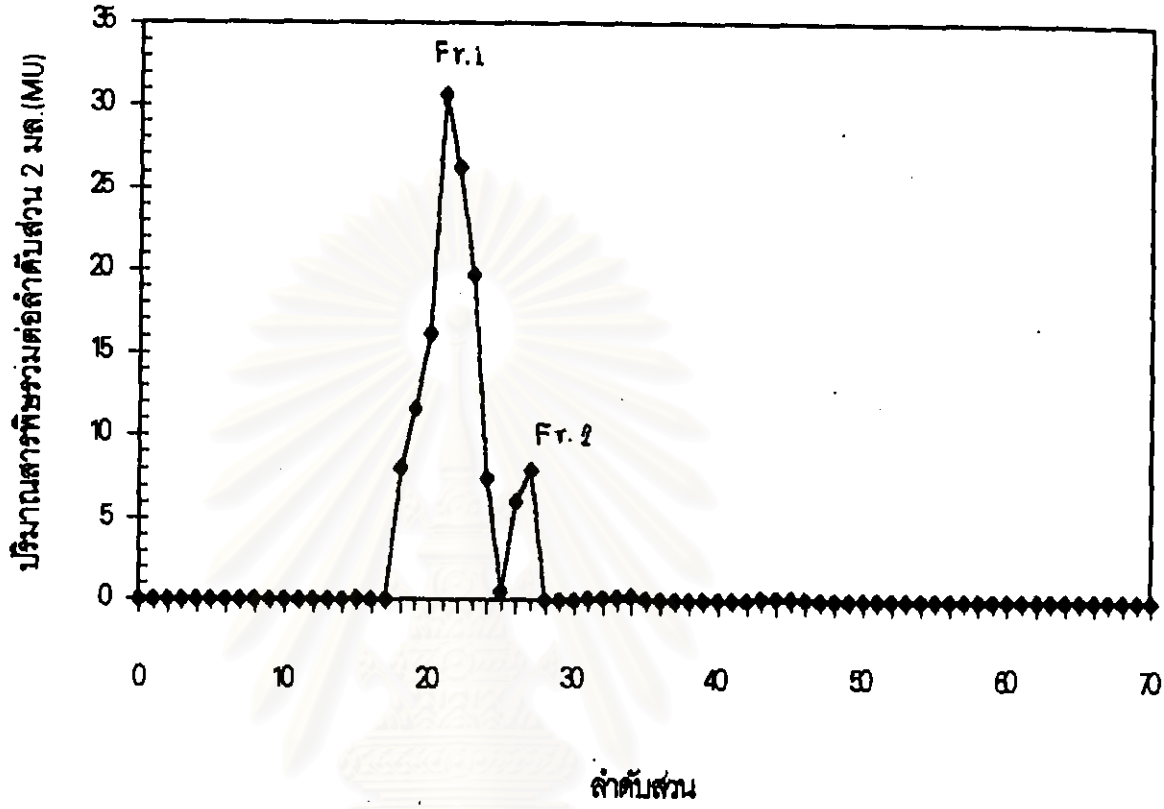
การดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์

นำสารพิษที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในบทที่ 3 หน้า 28 ปริมาณ 275.1512 MU ความเป็นพิษจำเพาะ 0.0125 MUต่อมก. มาดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์และสกัดสารพิษตามวิธีในหน้า 33 เมื่อหาปริมาณสารพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีปริมาณสารพิษรวม 224.6610 MU มีความเป็นพิษจำเพาะ 0.0205 MUต่อมก. ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า ยังคงเหลือปริมาณสารพิษ 81.65 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในตารางที่ 8.

การใช้โครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี 2

ผงแห้งของสารพิษที่สกัดได้จากผงถ่านกัมมันต์ มาละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 8 มล. นำมาผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 เก็บลำดับส่วน 2 มล. ตามวิธีในหน้า 33 นำแต่ละลำดับส่วนไปหา ปริมาณสารพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ผลดังรูปที่ 20. พบความเป็นพิษที่ลำดับส่วนที่ 18-24 และลำดับส่วนที่ 26-27 เมื่อรวมลำดับส่วนที่ 18-24 เข้าด้วยกันพบว่ามีปริมาณสารพิษ 119.9205 MU ความเป็นพิษจำเพาะ 0.0930 MUต่อมก. โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.4 เท่า และยังคงเหลือปริมาณสารพิษ 43.58 เปอร์เซนต์ นอกจากนั้นเมื่อรวมลำดับส่วนที่ 26-27 เข้าด้วยกัน พบว่ามีปริมาณสารพิษรวม 13.9521 MU ความเป็นพิษจำเพาะ 0.0156 MUต่อมก. ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.2 เท่า และมีปริมาณสารพิษเหลืออยู่ 5.07 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในตารางที่ 8.

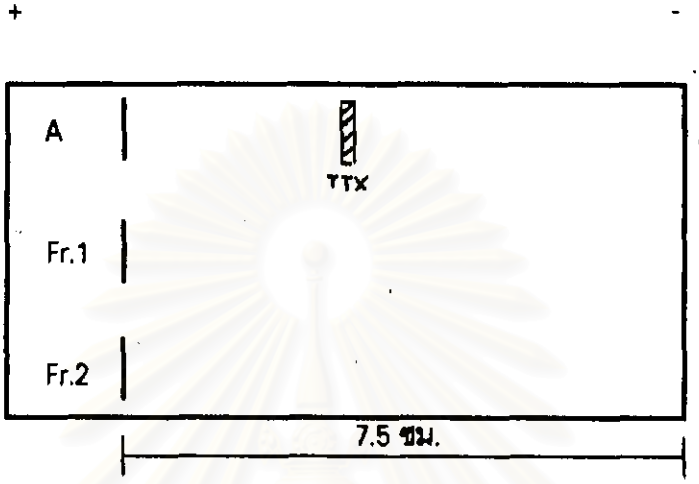
และเมื่อนำสารพิษจากทั้งสองส่วนไปหาชนิดของอนุพันธ์โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส พบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบเทโทรโดทอกซินไม่พบการเรืองแสงของสารพิษจากทั้งสองส่วน ดังรูปที่ 21. แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบอนุพันธ์กลุ่มพิษอัมพาตจากหอยพบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารจากลำดับส่วนที่ 18-24 ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอนุพันธ์ GTX4 และตำแหน่งที่มีระยะการเคลื่อนที่ของสารมากกว่าอนุพันธ์ GTX3 ดังรูปที่ 22.



รูปที่20 ปริมาณสารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล. จากการทำสารกึดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ไบโอเจล พี - 2 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. บรรจุเจลสูง 48 ซม. ชะสารพิษด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 15 มล.ต่อ ซม. เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ดังอธิบายในบทที่ 3 หน้า 33

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 18-24

Fr.2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 26-27



รูปที่ 21 การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางช่องโซเดียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

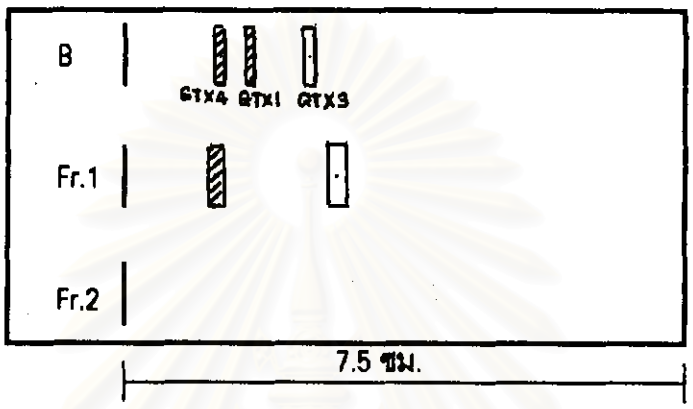
A คือ สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 18-24

Fr.2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 26-27

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางช่องโซเดียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

B คือ สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน (GTX1-4)

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 18-24

Fr.2 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 26-27

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

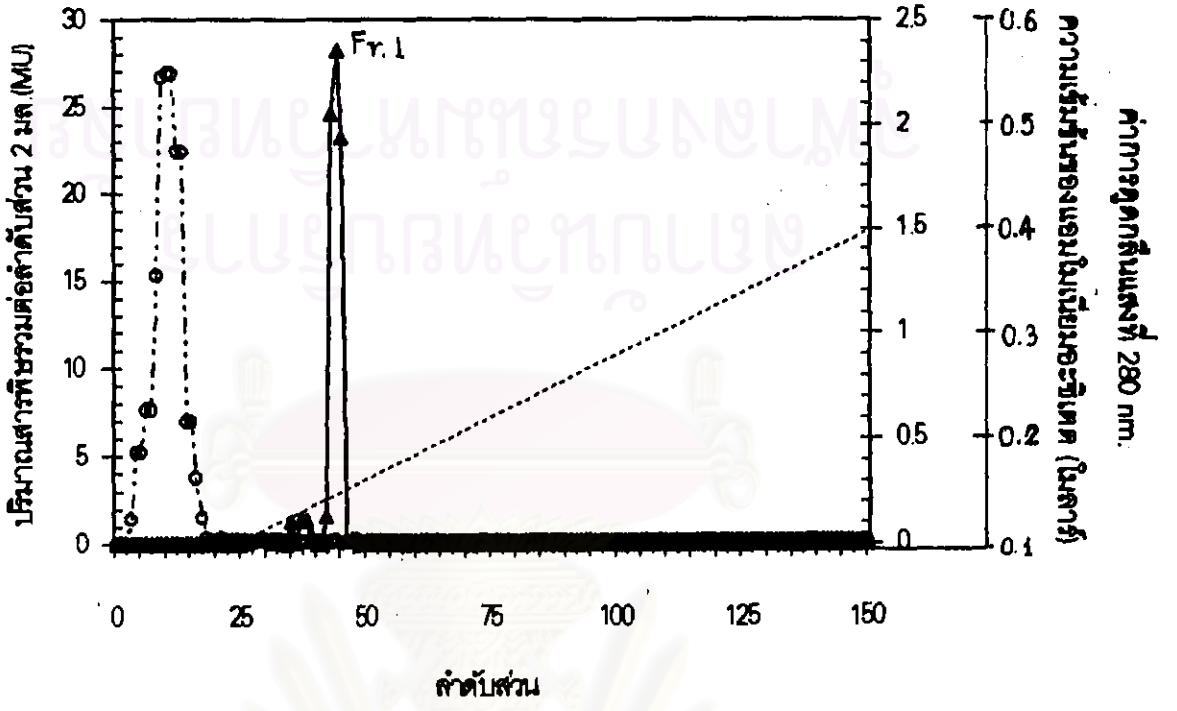
▭ คือ การเรืองแสงสีฟ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การใช้โครมาโตกราฟีบนซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25

นำสารพิษลำดับส่วนที่ 18-24 จากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ปริมาณ 119.9205 MU (1289.9 มก.) มาละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ปริมาตร 1.5 มล. และนำมาผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 ซม. บรรจุเจลสูง 20 ซม. อัตราการไหลของตัวชะ 15 มล.ต่อซม. เก็บลำดับส่วน 2 มล. ตามวิธีในหน้า 34 หาปริมาณสารพิษในแต่ละลำดับส่วนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ผลดังรูปที่ 23 . พบสารพิษออกมาในลำดับส่วนที่ 42-45 ที่ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตประมาณ 0.15-0.18 โมลาร์ มีปริมาณสารพิษรวม 77.6545 MU ความเป็นพิษจำเพาะ 0.6455 MUต่อมก. ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 51.6 เท่า ยังคงเหลือความเป็นพิษ 28.22 เปอร์เซนต์ ตารางที่ 8. สรุปผลจากขั้นตอนต่างๆในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 มีความบริสุทธิ์

เมื่อนำสารพิษที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส ไม่พบการเรืองแสงเมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบสารกลุ่มอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน ดังรูปที่ 24. แต่เมื่อใช้การวิเคราะห์ในระบบกลุ่มอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอย พบการเรืองแสงที่มีระยะใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอนุพันธ์ GTX4 ดังรูปที่ 25.



รูปที่ 23 ปริมาณสารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล. ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของแอมโมเนียมอะซิเตดจากการทำสารที่ดขวางช่องโซเดียมจากสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์โดย คอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 ซม.บรรจุเจลสูง 20 ซม. ชะสารพิษด้วยเกรเดียนท์ของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด ที่ความเข้มข้น 0.1-0.4 โมลาร์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ด้วยอัตราการไหล 20 มล. ต่อซม. เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ดังอธิบายในบทที่ 3 หน้า 34

—▲— สารพิษรวมต่อลำดับส่วน 2 มล.(MU)

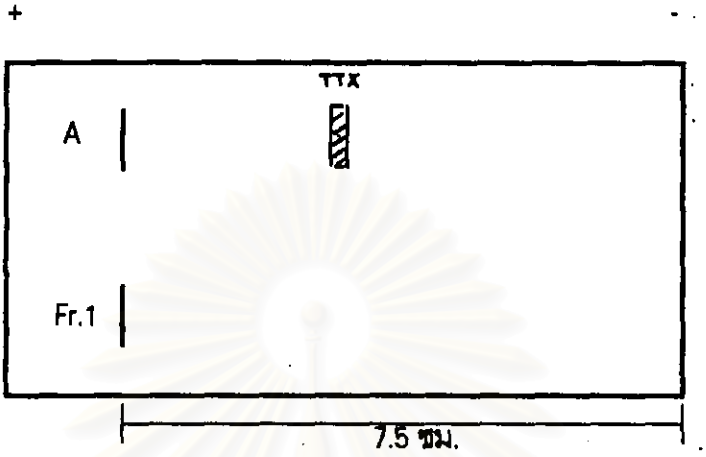
.....o..... การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

..... ความเข้มข้นของแอมโมเนียมอะซิเตด (โมลาร์)

ตารางที่ 8. สรุปผลการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 มีความบริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	ความเป็นพิษทั้งหมด(MU)	น้ำหนักแห้ง(มก.)	ความเป็นพิษจำเพาะ (MU/มก.)	เปอร์เซนต์ความเป็นพิษ(%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
1.สารพิษสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ	70	275.1512	21978.02	0.0125	100	1.0
2.สารพิษหลังการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์	200	224.6610	10976.1	0.0205	81.65	1.6
2.สารพิษหลังไบโอเจล พี-2	14	119.9205	1289.9	0.0928	43.58	7.4
3.สารพิษหลังซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี-25	8	77.6545	120.3	0.6455	28.22	51.6
*ลำดับส่วนที่มีความเป็นพิษสูงที่สุด	2	28.2512	31.2	0.9055	10.27	72.4

* คือ ลำดับส่วนหนึ่งในลำดับส่วนที่พบความเป็นพิษขั้นสารพิษหลังซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25



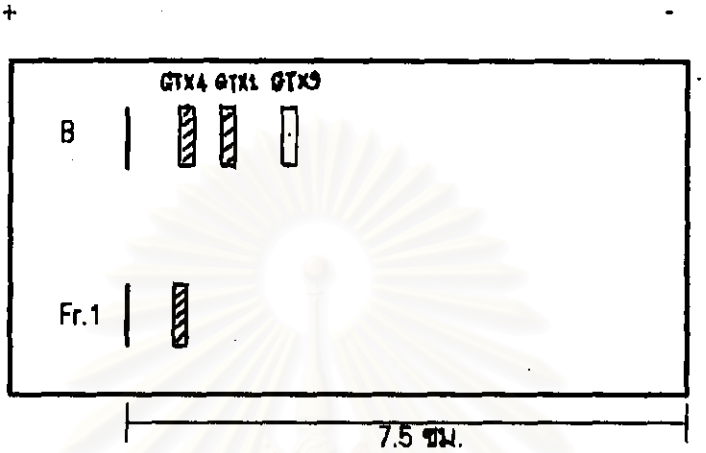
รูปที่ 24. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี-25 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

A คือ สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน

Fr.1 คือ สารจากลำดับส่วนที่ 42-45

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึ่งวางช่องโซเดียมสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 หน้า 35

B คือ สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน (GTX1-4)

Fr.1คือ สารจากลำดับส่วนที่ 42-45

▨ คือ การเรืองแสงสีเขียวเหลือง

▭ คือ การเรืองแสงสีฟ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

1. การหาค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยการทดสอบกับเนื้อเยื่อ

ผลการหาค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารมาตรฐาน GTX4 เมื่อใช้สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซินเป็นสารมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 9. พบว่าค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารมาตรฐาน GTX4 เท่ากับ 800 MU/mg. เนื่องจากค่านี้ได้จากความเข้มข้นของสารละลายสารพิษที่เหมาะสมเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารพิษจากเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในตารางที่ 10. จะเห็นได้ว่าสารมาตรฐาน GTX4 มีค่าความเป็นพิษจำเพาะมากกว่าสารพิษจากเซลล์ 2079.5 เท่า และมากกว่าสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1239.3 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9. การหาความเป็นพิษจำเพาะของสารมาตรฐาน GTX4

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน GTX4 (MUต่อ10 ไมโครลิตร)	% การรอดชีวิตของเซลล์ประสาทหนู	ความเป็นพิษจำเพาะ (MUต่อมก.)
0.0045	45.46	800
0.0023	31.18	600

หมายเหตุ สารละลายเทโทรโดทอกซินที่มีความเข้มข้น 0 MUต่อ10ไมโครลิตร ให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์ประสาทหนูเท่ากับ 30.68 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารมาตรฐาน GTX 4

สารพิษ	ความเป็นพิษจำเพาะ(MUต่อมก.)
สารมาตรฐาน GTX4	800
สารพิษจากเซลล์	0.3847
อาหารเลี้ยงเชื้อ	0.6455

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

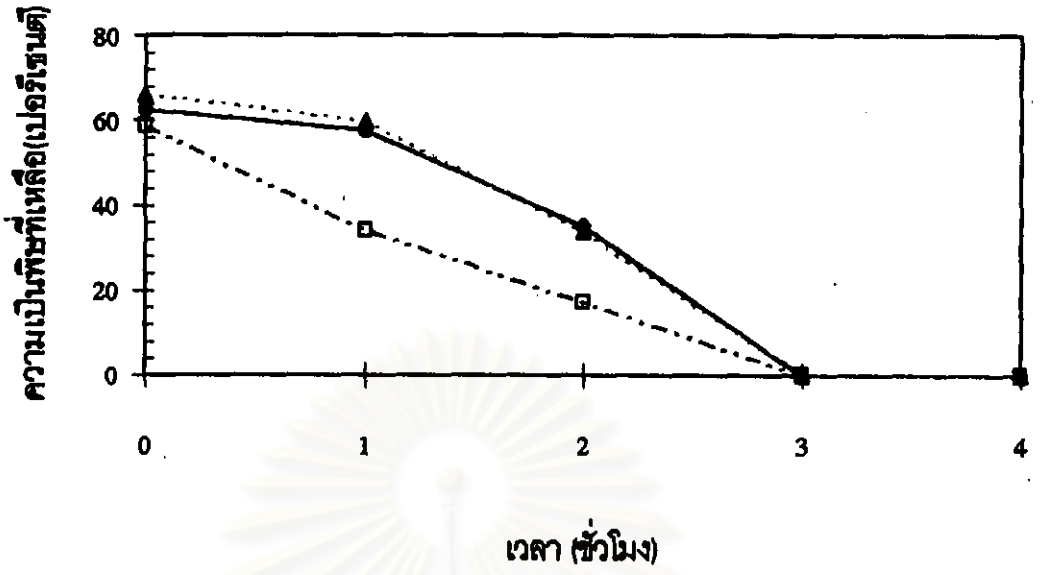
2. การทดสอบความเสถียรของสารกีดขวางช่องโซเดียมต่อความเป็นกรดด่างที่อุณหภูมิ 100 °ซ

จากการทดสอบความเสถียรของสารพิษต่อความเป็นกรดและด่างโดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 และ 8.5 ตามลำดับ และนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 °ซ เก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงเป็นเวลา 4 ชม. ผลการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อหาความเป็นพิษที่ทนต่อสภาพความเป็นกรดด่างที่เหลืออยู่ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 27. พบว่าในสภาพที่เป็นกรดคือค่าความเป็นกรดด่าง 3.0 สารพิษจากเซลล์แบคทีเรีย *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 จะทนต่อความร้อน 100 °ซ ได้ดีกว่าสารมาตรฐานเล็กน้อยที่ชั่วโมงแรกของการทดลองและทนได้ใกล้เคียงกันเมื่อเวลาต่อมา จะเสียสภาพความเป็นพิษทั้งหมดที่ชั่วโมงที่ 3 ซึ่งเท่ากับสารมาตรฐาน GTX4 สารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อจะทนต่ออุณหภูมิ 100°ซ ได้น้อยที่สุดและเสียสภาพความเป็นพิษทั้งหมดที่เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง แต่เมื่อสารพิษอยู่ในสภาพเป็นด่างคือค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.5 สารพิษจะเสียสภาพและลดความเป็นพิษลงมากตั้งแต่เริ่มละลาย สารพิษจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อจะเสียสภาพความเป็นพิษทั้งหมดที่อุณหภูมิ 100 °ซ เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ส่วนสารมาตรฐานจะเสียสภาพความเป็นพิษหมดที่ชั่วโมงที่ 2 ของการทดลอง สารพิษจากภายในเซลล์จะทนความร้อน 100 °ซ ในสภาพกรดด่างที่ 8.5 ไม่ได้เลย แต่สารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อจะทนได้เล็กน้อยจะเห็นได้จากยังมีความเป็นพิษเหลืออยู่ ดังรูปที่ 26

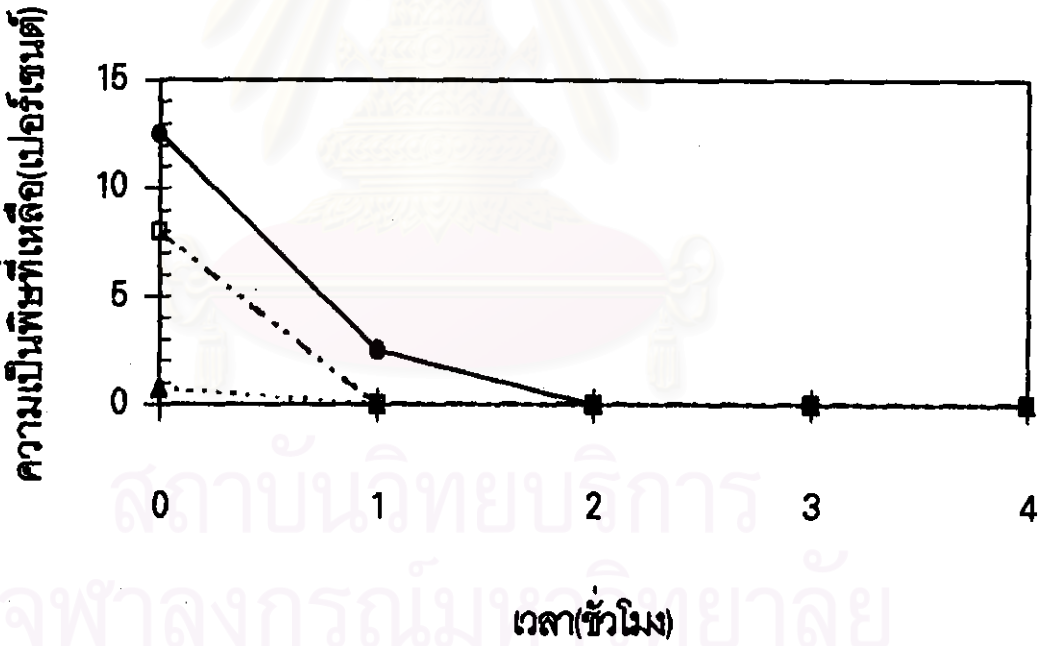
3. การทดสอบความเสถียรของสารกีดขวางช่องโซเดียมต่ออุณหภูมิในสภาพความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3

จากการทดสอบความเสถียรของสารพิษต่ออุณหภูมิ โดยเตรียมสารละลายสารพิษให้มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 เนื่องจากในข้อ 2 พบว่าสารพิษมีความเสถียรที่สภาพนี้ และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 °ซ และ 100 °ซ หลังจากเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปทดสอบหาความเป็นพิษที่เหลือโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังแสดงในรูปที่ 27. พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 ที่อุณหภูมิสูงสารพิษจะเสียสภาพมากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ จากผลการทดลองที่อุณหภูมิ 80°ซ สารพิษจากเซลล์ จะทนต่ออุณหภูมิได้ดีกว่าสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และที่อุณหภูมิ 100°ซ สารพิษจากเซลล์ จะทนต่ออุณหภูมิได้ดีกว่าสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อและสารมาตรฐานเพียงเล็กน้อย สารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อจะทนต่ออุณหภูมิได้น้อยที่สุด และที่เวลา 3-4 ชั่วโมง สารพิษทั้งหมดเสียสภาพความเป็นพิษ

ก.

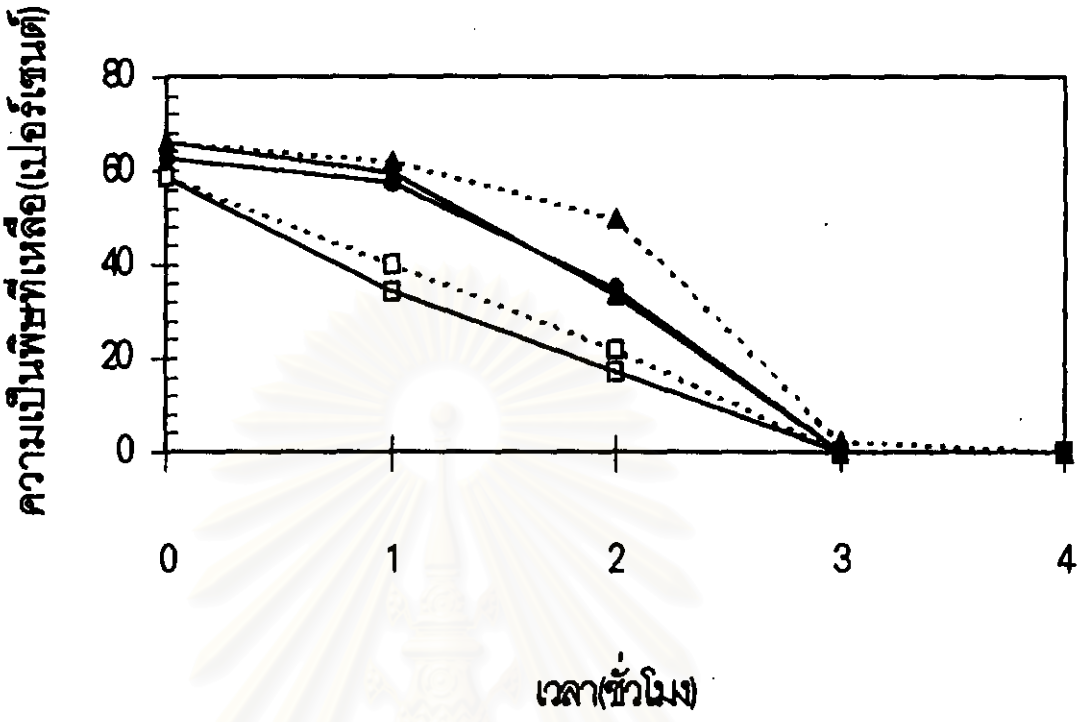


ข



รูปที่ 26 ความเสถียรของสารกีดขวางช่องโซเดียมต่อสภาพความเป็นกรดด่าง
ก. สภาพความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.0 ข. สภาพความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.5
—o— สารมาตรฐาน GTX 4 ---□---สารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อ
---▲--- สารพิษจากภายในเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 ความเสถียรของสารกีดขวางช่องโซเดียมต่ออุณหภูมิ 80°ซ และ 100 °ซ ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 3.0

—⊖— สารมาตรฐาน GTX 4 , อุณหภูมิ 100 °ซ
····▲···· สารพิษจากภายในเซลล์ , อุณหภูมิ 80 °ซ
—▲— สารพิษจากภายในเซลล์ , อุณหภูมิ 100 °ซ
···⊟··· สารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อ , อุณหภูมิ 80 °ซ
—⊟— สารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อ , อุณหภูมิ 100 °ซ