รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

ณฐินี สุวรรณสิงห์. 2533. เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียในทะเล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยา, กรุงเทพมหานคร, 109 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: 125-134.

เนาวรัตน์ กุลพัณน์ และวรรณิพา วิเวโก. 2537. การทำให้สภาวะกรดด่างคงที่ในระหว่างการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp. จากทะเล. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 37 หน้า.

เบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย 2538. ผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษและไม่มีพิษต่อการสร้างเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยา, กรุงเทพมหานคร, 115 หน้า.

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

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพมหานคร, ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, 250 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Anderson, H., 1954. The reddening of salted hides and fish. Appl.Microbiol. 2: 64-69.

Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F. (eds.). 1973. The Characteristics of Biological Material in Biochemmical Engineering 2nd ed. Academic Press Inc., New York.

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

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

Bernfeld, P., 1955. In Colowick, S.P., and kaplan, N. O. (eds.). Method of Enzymology. vol.1, Academic Press, New York., New York.

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.

Catterall, W.M. 1985. The voltage sensitive sodium channel: A receptor for muliple neurotoxin. 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 sediment. Appl.Environ.Microbiol. 59(11): 3934-3937.

_____. 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.

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

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.

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.

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

Kawabata, T. 1978. The Manual for The Methods of Food Sanitation Test : Vol.2. Tokyo, Japan Food Hygienic Association, 232-240.

Kao, C.Y., 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.

Kao, C.Y. 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.

_____. Fuhrman F. A. 1963. Pharmacological studies on tarichatoxin, Apotent neurotoxin. J. Physiol. 140: 31-40.

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

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

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

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

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.

Macleod, R. A., Onofrey, E. and Norris, M.E. 1954. Nutrition and metabolism of marine bacteria. I. Survey of nutritional requirements. J.Bacteriol. 68: 680-686.

Macleod, R. A., and Onofrey, E. 1957. Nutrition and metabolism of marine bacteria. III. The relation of sodium and potassium to growth. J.Cell.Comp.Physiol. 50: 389-401.

Matsumura, K. 1995. Amonoclonal antibody againt tetrodotoxin that reacts to the active group for the toxicity. Euro. J. Pharmacol. 293: 41-45.

Mosher, H.S., 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.

Narahashi,T., Deguchi, T., Urakawa, N., and Ohkubo, Y. 1960. Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin. Am.J.Physiol. 198: 934-974.

_____. Moore, J, W., and Scott, W, R. 1964. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axon. J.Gen Physiol. 47: 965-974.

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., 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 cringer*. 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.

_____. Noguchi, T., 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.

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 Phycotoxin'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.

Ostroff, R., and Henry, B.S. 1939. The utilization of various nitrogen compounds by marine bacteria. J.Cell.Comp.Physiol. 13: 353-371.

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

Proctor, N.H.,Chan, S.L., and Trevor, A.J. 1976. Production of saxitoxin by cultures of *Gonyaulax catenella*. Toxicon. 13: 1-9.

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.

Sheumack, D.D., Howden, M.E.H., Spence, I., and Quinn, R.J. 1978. Maculotoxin : A neurtoxin 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.

_____. Fallon, W.E., Wekell, J.C., Gerger, 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

Sikyta Bolumil 1983. Nitrogen source. Method in Industrial Microbiology. Ellis Horwrod Limited, John Wiky & Sons.

Simidu, U., Kita-Tsukamoto K ., Yasumoto T., and Yotsu M. 1990. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. Int.J.Syst.Bacteriol. 40: 331-336.

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

Soltero, F.V. and Johnson, M.J. 1953. Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. Q 126. Appl.Microbiol. 1: 52-57.

Stayermark, A.L. 1951. Quantitative Organic Microanalysis: Microdetermination of Nitrogen by The Kjeldahl Method. The Blakiston Comp. N.O.

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.

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

Zobell, C. E., and Feltham, C, B. 1935. The occurrence and activity of urea splitting bacteria in the sea. Science. 81: 234-371.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

<u>หมายเหตุ</u> อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโออาร์ไอที่ใช้ทำเป็นอาหารสำหรับเก็บเชื้อตั้งต้นเติมวุ้นผงเพียง 8 กรัม และบรรจุลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ แล้ววางเอียง (slant)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ได้จากงานวิจัยนี้

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	18.0	กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	3.5	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 . 2H_2O$)	0.5	กรัม
	โพลีเปปโตน (polypeptone)	1	กรัม
	สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
	กลูโคส (glucose)	2	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มล. ปรับความเป็นกรดด่าง 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

4. น้ำทะเลสังเคราะห์ (artificial sea water)

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25.0	กรัม
	ทริสบัฟเฟอร์ ($C_4H_{11}O_3$)	1.0	กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_47H_2O$)	1.0	กรัม
	แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.0	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.3	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.4	ไมโครกรัม
โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	1.0	ไมโครกรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(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 และผสมรวมกับสารละลายทริสที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้ว และเติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 1000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้เติมวิตามิน บี 12 และไบโอตินที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้ว

<u>หมายเหตุ</u> ดัดแปลงจากสูตรของ Schroder and Van (1980) ซึ่งใช้กรดบอริค, โซเดียมโมลิบเดท 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-glutamin)	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.
แอล-วาลีน (Lvaline)	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 (pyridoxin 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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.
ฟีนอล เรด (phenol red)	5.0	มก.

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Gibco BRL, USA. 1 ซอง(10.4 กรัม) ละลายในที่น้ำกลั่นสองครั้งที่มีปริมาตร 1000 มล. และกรองด้วยกระดาษกรองที่มีความกว้างของ ช่องขนาด 0.45 ไมครอน และ 0.22 ไมครอน ตามลำดับ เติม Fetal bovine serum ของบริษัท Gibco, USA. 10 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตรและบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อ และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำออกมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ประมาณ 15-20 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 ปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 สารละลายสำหรับทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงหลุดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์

ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(phosphate buffer solution)

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.25	กรัม
	ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.75	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	4.55	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นที่สองครั้ง (double distilled water) ปริมาตรประมาณ 400 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.3 และเติมน้ำกลั่นสองครั้งจนมีปริมาตรครบ 500 มล. นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) 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.

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

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

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

5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเอช พี แอล ซี (HPLC)

5.1 สารละลายสำหรับอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซิน

5.1.1 สารละลายโมบายส์เฟส (mobile phase solution)

ประกอบด้วย อะซีโตไนไตรท์ (CH_3CN) 30.0 มล.
แกลเซียลอะซีติค แอซิด (CH_3COOH) 3.0 มล.
เฮปตาฟลูออโรบิวทิริค แอซิด ($C_4HF_7O_2$) 1.0 มล.

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นสองครั้งที่กรองแล้วปริมาตร 900 มล.ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. และนำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.0 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (Conc.NH_4OH) และสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัลเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 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

<u>สารตั้งต้น</u> (stock solution)

ก. สารละลายโซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนต ความเข้มข้น 100 mM.

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

ข. สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 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 เปอร์เซนต์ 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 สารละลายโมบายส์เฟส สำหรับวิเคราะห์อนุพันธ์ชัคชิทอกซิน

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 สารละลายโมบายส์เฟส สำหรับวิเคราะห์อนุพันธ์กอนิออทอกซิน

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

5.2.4 สารละลายกรดอะซิติค เข้มข้น 50 mM.

ดูดแกลเซียลอะซิติคแอซิคปริมาตร 0.29 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตรเติมน้ำกลั่นสองครั้งจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

หมายเหตุ สารเคมีที่นำมาใช้ในการเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกึดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเอช พี แอล ซี ทั้งหมดเป็นสารเคมีในระดับ HPLC grade หรือระดับ analytical reagent grade และสารละลายที่เตรียมได้นั้น ก่อนนำมาใช้ต้องนำมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีความกว้างของช่องขนาด 0.45 ไมครอน และต้องกำจัดฟองอากาศ (degas) ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงออกก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

6. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกึดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)

6.1 สารละลายทริสบัฟเฟอร์ (tris buffer) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ความเป็นกรดด่าง 8.7 ประกอบด้วย

สารละลาย A : ชั่งทริส ($C_4H_{11}NO_3$. HCl) 2.42 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

สารละลาย B : ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 19.67 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายผสมปริมาตร 16.2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย A

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 8.7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl)

6.2 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide solution) เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์

ดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ 3.33 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide solution) เข้มข้น 3 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 12.0 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดสีชาปริมาตรจนครบปริมาตร 100 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

7. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid : DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ 20 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มล. เติมโปแทสเซียมโซเดียมตาเตรท ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) 30 กรัม ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

8. การเตรียมสารละลายที่ใช้ใน Kjeldahl Method

8.1 ของผสมของเกลือ (salt mixture) ประกอบด้วยไดโปแทสเซียสซัลเฟต (K_2HSO_4) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ในอัตราส่วน 19:1

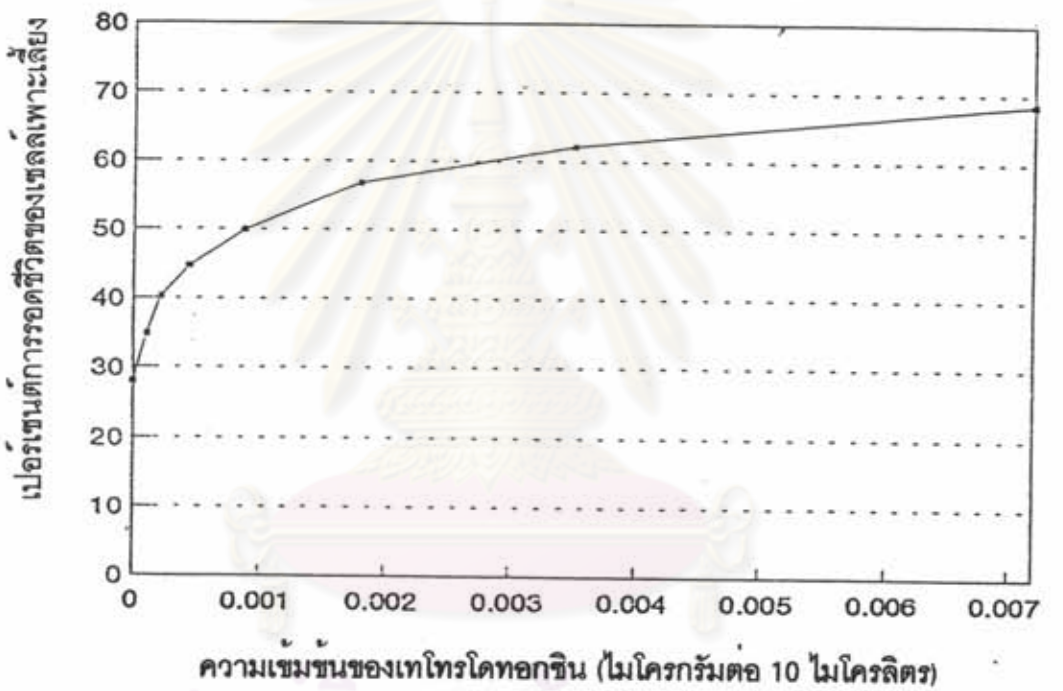
8.2 อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) ละลายบรอมคลีซอลกรีน (brom cresol green) 0.1กรัม และเมธิลเรด (methyl red) 0.1 กรัม ในเอธานอล เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 150มล.

8.3 สารละลายมาตรฐานกรดเกลือ (HCl) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ หาความเข้มข้นแน่นอนโดยการติเตรทกับสารละลายด่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานของสารเทโทรโดทอกซินที่ใช้หาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture assay)

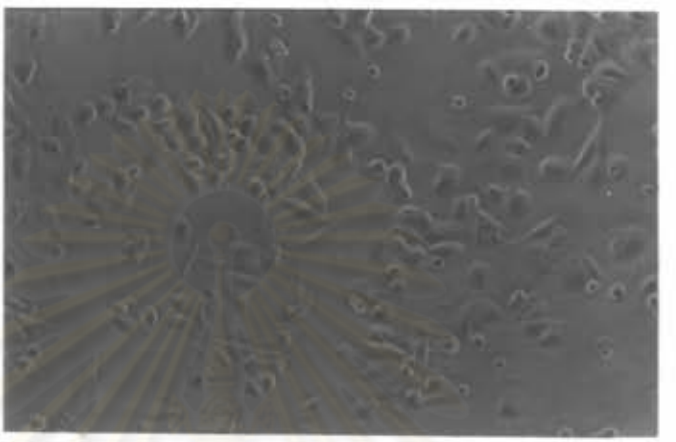


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตกับปริมาณเทโทรโดทอกซิน (ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร)

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

A



B

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 500 เท่า

A. ลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิต

B. ลักษณะของเซลล์ที่ตาย

3. การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมบริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์

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

3.1 วิธีเตรียมคอลัมน์

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

3.2 การทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์เซพแพค ซี 18

นำสารละลายของสารตัวอย่างที่สกัดได้มาผ่านคอลัมน์เซพแพคซี 18 ที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 โดยให้มีอัตราการไหล (flow rate) 1.0 มล.ต่อนาที จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยกรดน้ำส้ม 0.1 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 20 มล. เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารพิษจากแบคทีเรีย สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

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

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) เป็นวิธีการทางสถิติที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบเกี่ยวกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากร ในกรณีมีกลุ่มประชากรตั้งแต่สองกลุ่มขึ้นไป โดยมีตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียว เช่นต้องการเปรียบเทียบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ซึ่งวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนมีข้อตกลงเบื้องต้น (assumption) โดยข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ควรมีลักษณะตามข้อตกลงเบื้องต้นดังต่อไปนี้

1. กลุ่มตัวอย่าง เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงเป็นโค้งปกติ
2. ค่าของตัวแปรตามแต่ละหน่วยเป็นอิสระต่อกันทั้งภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มสมมุติฐาน

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

$H_1 = u_1$ อย่างน้อยหนึ่งตัวมีค่าแตกต่างจากกลุ่มอื่น

- ค่าสถิติ

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

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

J = จำนวนกลุ่ม

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

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

$$Ss_w = \sum n_i (X_i - X)^2$$

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

เป็นวิธีการทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากรว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากรคู่ใดที่แตกต่าง โดยใช้สูตร

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

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 production
2. data list free/ x 1-4(2) groop 5
3. begin data
        16811
        16871
        26591
        64272
        57562
        52922
   end data
   t-test groups = group (1,2) / var = x
```

เมื่อเขียนข้อมูลและคำสั่งต่างๆ ได้ถูกต้องตามคู่มือการใช้โปรแกรม SPSS-PC แล้วเครื่องคอมพิวเตอร์จะทำการประมวลผลและแสดงผลลัพธ์ตามที่ต้องการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การหาปริมาณไนโตรเจน (nitrogen content) ด้วยวิธี Kjeldahl (Stayemark, 1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษาปริมาตร 50 มล. มาทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) นำผงที่ได้ใส่ในขวดกลั่นขนาด 750 มล. เติมซอลท์มิกเจอร์ (salt mixture) 7 กรัม ซึ่งประกอบด้วยไดโปแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$) ในอัตราส่วน 19:1 ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 15 มล. ลงไป จากนั้นนำไปย่อยบนเตาหลุม (digest) ในตู้ควัน จนได้สารละลายใส นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. จากนั้นนำไปหลั่นบนเตากลั่นดดยดักจับแอมดมเนีย (NH_3) ที่เกิดขึ้นด้วยกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ผสมอยู่ 3 หยด กลั่นจนสารละลายบอริคมีปริมาตร 200 มล. จึงนำสารละลายที่ได้มาไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว และคำนวรหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์ไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{A \times B \times 1.4}{C}$$

A = ปริมาตรกรด HCl (มล.)

B = ความเข้มข้นของกรด HCl (M)

C = ปริมาตรสารตัวอย่าง (มล.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธีของ Bernfeld

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) 1 มล. ลงในสารตัวอย่างที่เจือจางจนเหมาะสมแล้ว ปริมาตร 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวนหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างดดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มก.ต่อมล. ทำการวิเคราะห์ข้างต้นแล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนันทวัน ฤทธิ์เดช เกิดเมื่อวันที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดศรีสะเกษ และได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ในปีการศึกษา 2534 และเข้ารับการศึกษาต่อในชั้นปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2536 และในปีการศึกษา 2537 ได้รับทุนโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ ที่อยู่ปัจจุบัน 87 หมู่ 1 ต. สำโรง อ. อุทุมพรพิสัย จ. ศรีสะเกษ 33120

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย