รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

เบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย. 2538. ผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษ และไม่มีพิษต่อการสร้างเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิชญา เทียนทองดี. 2535. แบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในหอยสองฝาชนิดที่มีพิษและไม่มีพิษที่เก็บจากบริเวณเกาะสีชัง. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภผล เทพเฉลิม. 2527. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ใช้เป็นอาหารในภาคใต้ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .

ภาษาอังกฤษ

Barber, K.G., Kitts, D.D., Townsley, P.M., and Smith, D.S. 1988. Appearance and partial purification of a high molecular weight protein in crabs exposed to saxitoxin. Toxicon 26(11): 1027-1034.

Beitler, M.K. and Liston, J. 1990. Uptake and tissue distribution of PSP toxins in butter clams. In E. Granneli (ed.), Toxic Marine Phytoplankton, pp. 257-261. New York: Elsevier.

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., Sulivan, 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, pp. 218-286. New York: Elsevier.

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.

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, pp. 329-342. New York: Elsevier.

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., 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 12(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.

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, pp. 575-588. New York: Plenum Press.

Heinrikson, R. L. and Meredith, S. C. 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography:precolumn derivatezation with phenyliso-theocyanate. Anal. Biochem 136: 65.

Hwang, D.F., 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.

_____. D.F., Chueh, C.H., and Jeng, S.S. 1992. Occurrence of a new toxin and tetrodotoxin in two species of the gastropod mollusk nassariidae. Toxicon 30(1): 41-46.

_____. Cheng, C.A., Chen, H.C., Jeng, S.S., Noguchi, T., Ohwada, K., Hashimoto, K. 1994. Microflora and tetrodotoxin-producing bacteria in the lined moon shell Naticalineata. Fisheries Science 60(5): 567-571.

_____. Cheng, C.A., Tsai, H.T., Shih, D.Y.C., Ko, H.C., Yang, R.Z., Jeng, S.S. 1995. Indentification of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in marine gastropods implicated in food poisoning. Fisheries Science 61(4): 675-679.

_____. Noguchi, T., Nagashima, Y., Liao, I.C., and Hashimoto, K. 1987. Occurrence of paralytic shellfish poison in the purple clam *Soletellina diphos* (bivalve). Bull. Jpn. Soc. scient Fish. 53: 623-626.

_____. Tai, K.P., Chueh, C.H. Lin, L.C., and Jeng, S.S. 1991. Tetrodotoxin and derivatives in several species of the gastropod natecidae. Toxicon 29(8): 1019-1024.

Ikawa, M. Auger, K., Mosley, S.P., Sasner, J.J., Noguchi, T.,and Hashimoto, K . 1985. Toxin profiles of the blue green alga *Aphanizomenon flos-aquae.* In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellate, pp. 299.304. New York: Elsevier.

Jellett, J., Marks, L.J., Stewart, J.E., Dorey, M.I. Watson-Wright, W., and Lawrence, J.F. 1992. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays : automated endpoint determination and standardization of the in vitro tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. Toxicon 30(10): 1143-1156.

Jonas-Davies, Jac and Liston, John. 1985. The occurrence of PSP toxins in intertidal organisms. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellate, pp. 467-472. New York : Elsevier.

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. 1996. Toxins similar to PSP and TTxs produced by bacteria associated with sand clam (*Asaphis violascens*) in the Gulf of Thailand. J.Mar.Biotechnol 3: 268-273.

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

_____. Ogata, T., and Sato, S. 1988. Bacteria production of saxitoxin. Agric. Biol. Chem 52(4): 1075-1077.

_____. 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 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 Colwell, 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.

Koyama, K., Noguchi, T., Ueda, Y., and Hashimoto, K. 1983. Resistibility of toxic and nontoxic crabs against paralytic shellfisg poison and tetrodotoxin. Nippon Suisan Gakkaishi 49: 485-489.

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.

Leake, L.D., and Walker, R.J. 1980. Invertebrate neuropharmacology. New York: A halsted press book.

Matsui, T., Hamada, S., and Konosu, S. 1981. Difference in accumulation of puffer fish toxin and crystalline tetrodotoxin in the puffer fish, *Fugu rubripes rubripes*. Bullatin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 47(4): 535-537.

Matsumura, K. In vivo neutralization of tetrodotoxin by a monoclonal antibody. 1995. Appl. Environ. Microbiol 61(9): 3468-3470.

Mee, L.D., Espinosa, M., Diaz, G. 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the pacific coast of Maxico. Marine Environmental Research 19: 77-92.

Miyazawa, K., Higashiyama, M., Ito, Keiji., Noguchi, T., Arakawa, O., Shida, Y., and Hashimoto, K. 1988. Tetrodotoxin in tow species of ribbon worn (nemertini), *Lineus fuscoviridis* and *Tubulanus punctatus*. Toxicon 26(9): 867-874.

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

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

Narahashi, T., Moore, J.W., and Posten, R.N. 1967. Tetrodotoxin derivatives:chemical structure and blockage of nerve membrane conductance. Science 156: 976-978.

Narita, H., Matsubara, S., Miwa, N., Akahane, S., Muradami, 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 terodotoxin 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, pp. 293-298. New York: Elsevier.

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

_____. 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.

_____ 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.

_____. Sato, S., and Kodama, M. 1989. Paralytic shellfish toxins in bivalves which are not associated with dinoflagellates. Toxicon 27(11): 1241-1244.

Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraeff, G., and Blackburn, S. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. Toxicon 25(10): 1105-1111.

Ross, M.R., Signer, A., Abbott, B. C. 1985. The house fly: an acceptable subject for paralytic shellfish toxin. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellate, pp. 433-438. New York: Elsevier.

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.

Saitanu, K., Wisessang, S., Yongvanich, T., Piyadamchana, T., Ogata, T., Sato, S., and Kodama,M. 1992. Occurrence of toxins similar to Pstoxins and TTX in Green Mussel (Perna vindis and Sand clam (Asaphis violascens) which are not associated with toxic dinoflagellates. In P. Gopalakrishnakone and C.K. Tan (eds), Recent Advance in Toxinology Research vol.2., pp. 486-489. University of Singapore: Singapore.

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 neurotoxin from the vemon glands of octopus *Hepalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin. Science 199: 188-189.

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.

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

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.

Sulivan, J.J., LeBlanc, M., and Anderson, R.J. 1985. The assimilation of PSP toxins by copepod *Tigriopus californicus* from dietary *Protogonyaulax catenella*. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellate, pp. 407-412. New York:Elsevier.

Walne, P.R. 1974. Culture of Bivalve Molluscs. London: The white-friars Press Ltd.

White, A.W., Martin, J.L., Legresley, M., and Blogoslawski, W.J. 1985. Inability of ozonation to detoxify paralytic shellfish toxins in soft-shell clams. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellate, pp. 473-478. New York: Elsevier.

Wisessang, S., Ogata, T., Kodama, M., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Saitanu, K., Yongvanich, T., and Piyadarnchana, T. 1991. Accumulation of paralytic shellfish toxins by green mussel *Perna viridis* by feeding on cultured cells of *Alexandrium cohorticula* isolated from the gulf of Thailand. Nippon Suisan Gakkaishi 57(1): 127-131.

Yang, L. Kao, C.Y., and Yasumoto, T. 1992. Actions of decarbamoyloxysaxitoxin and decarbamoylneosaxitoxin on the frog skeletal muscle fiber. Toxicon 30(5/6): 645-652.

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. 1985. Recent progress in the chemistry of dinoflagellate toxins. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellate, pp. 259-270. New York: Elsevier.

_____. T., 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 derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a pufferfish. Toxicon 25(2): 225-228.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Juntongjin et al., 1993)

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	17.53	กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	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 ± 1นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโออาร์ไอ (ORI medium) (Simidu et al., 1983)

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำทะเลสังเคราะห์ปริมาตร 900 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล.ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.0±1 นำไปต้มให้ละลายและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที

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

3. น้ำทะเลสังเคราะห์ (artificial sea water) (Schroder and Van., 1980)

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25.0	กรัม
	ทริสบัฟเฟอร์ ($C_4H_{11}O_3$)	1.0	กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	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 และผสมรวมกับสารละลายทริสที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้ว และเติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 1000 มล. นำไปนึ่ง

ฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้เติมวิตามิน บี12 และไบโอตินที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้ว

หมายเหตุ 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-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.
	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.
ฟีนอล เรด (phenol red)	5.0	มก.

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Gibco BRL, USA. 1 ซอง(10.4 กรัม) ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 1000 มล. แล้วกรองด้วยกระดาษกรองที่มีช่องขนาด 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

5. อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Walne' s medium) (Walne., 1974)

ประกอบด้วย	โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	100.0	กรัม
	โซเดียมอีดีทีเอ (Na_2EDTA)	45.0	กรัม
	กรดบอริก (H_3BO_3)	33.6	กรัม
	โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.H_2O$)	20.0	กรัม
	เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)	1.3	กรัม
	แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	0.36	กรัม

trace metal primary stock

ประกอบด้วย	ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	2.1	กรัม
	โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	2.0	กรัม
	แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)	0.9	กรัม
	คอบเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	2.0	กรัม
	น้ำกลั่น	100.0	กรัม

วิตามินรวมประกอบด้วย

วิตามินบี 1	1.0	กรัม
วิตามินบี 12	5.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มล. เติม trace metal primary stock 1.0 มล. วิตามินรวม 1.0 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121^{0}ซ) เป็นเวลา 15 นาทีเก็บเป็น stock solution ก่อนใช้นำไปเจือจาง 1 มล. ต่อน้ำทะเล 1000 มล.

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) ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง (double distilled water) ปราศจากเชื้อ 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. นำไปปรับค่าความเป็นกรดด่าง 7.3 และเติมน้ำกลั่นสองครั้ง จนมีปริมาตรครบ 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.

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. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธี เอชพีแอลซี

5.1 สารละลายรี-ดราย (redry solution)

ประกอบด้วย	เอทธานอล (ethanol)	200	ไมโครลิตร
	น้ำกลั่น (dilstilled water)	200	ไมโครลิตร
	ไตรเอทธิลลามีน (triethylamine)	100	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดและเก็บไว้ที่ -20°ซ

5.2 สารละลายดีริเวอร์ไทซิ่ง (derivatizing solution)

ประกอบด้วย	เอทธานอล (ethanol)	140	ไมโครลิตร
	น้ำกลั่น (distilled water)	20	ไมโครลิตร
	ไตรเอธิลเอมีน (triethylamine)	20	ไมโครลิตร
	ฟีนิลไอโซไธโอไซยาเนต (phenylisothiocyanate)	20	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนนำมาทำการทดลอง และสารละลายนี้ควรใช้ภายใน 2 ชั่วโมง

5.3 สารละลายที่ใช้เป็นตัวชะ(eluent) ในคอลัมน์เอช พี แอล ซี ได้แก่สารละลาย A และสารละลาย B

ประกอบด้วย โซเดียมอะซิเตท ไตรไฮเดรท

(sodium acetate trihydrate)	19.0	กรัม
ไตรเอทิลเอมีน (triethylamine)	0.5	มล.
สารละลายอีดีทีเอ 1000 ppm		
(stock EDTA solution)	200	ไมโครลิตร
อะซิโตไนไตรท์ (acetonitrile)	60	มล.

สารละลาย A

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มล. นำไปไตเตรทด้วยกรดอะซิติกให้ได้ความเป็นกรดด่าง 6.4 กรองผ่านแผ่นกรอง triton-free ตวงสารละลายปริมาตร 940 มล. เติมอะซิโตไนไตรท์ 60 มล. นำไปกำจัดฟองอากาศ (degas) ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงก่อนนำมาใช้

สารละลาย B

ผสมอะซิโตไนไตรท์ 600 มล. ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มล.ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลายอีดีทีเอเข้มข้น 2000 ส่วนในพันส่วน จำนวน 200ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปกำจัดฟองอากาศก่อนนำมาใช้

6. สารละลายสำหรับการทำอิเลคโตรโฟริซิส

6.1 สารละลายทริสบัฟเฟอร์ (tris buffer) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ความเป็นกรดด่าง 7.8

ชั่งทริสบัฟเฟอร์ 2.42 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.7 ด้วย 0.2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริค เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร

6.2 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide solution) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรจนครบ 100 มล.

6.3 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenhydroxide) เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์

ดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 35 เปอร์เซนต์ 1 มล. เติมน้ำกลั่นใน 34 มล. เก็บในขวดสีชา และเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

7. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซิน โดยวิธีเอชพีแอลซี (HPLC)

7.1 สารละลายสำหรับอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซิน

7.1.1 สารละลายโมบายส์เฟส (mobile phase solution)

ประกอบด้วย	อะซีโตไนไตรท์ (CH_3CN)	30.0	มล.
	แกลเซียลอะซีติค แอซิค (CH_3COOH)	3.0	มล.
	เฮปตาฟลูออโรบิวทิริค 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

7.1.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มัล (4N NaOH)

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

7.2 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. สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 250 mM.

ชั่งไดโซเดียมฟอสเฟต 44.77 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตรครบ 500 มล.

ค. สารละลายกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 500 mM.

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

ง. สารละลายกรดเปอร์ไอออดิก ความเข้มข้น 350 mM.

ชั่งกรดเปอร์ไอออดิก (H_5IO_6) ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

7.2.1 สารละลายโมบายเฟส 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

7.2.2 สารละลายโมบายเฟส สำหรับวิเคราะห์อนุพันธ์กอนิออทอกซิน

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

7.2.3 สารละลายตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent)

ผสมสารละลาย ง. 10 มล. และสารละลาย ข. 100 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 300 มล. และปรับความเป็นกรดด่างเป็น 9.0 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มล.

7.2.4 สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 50 mM.

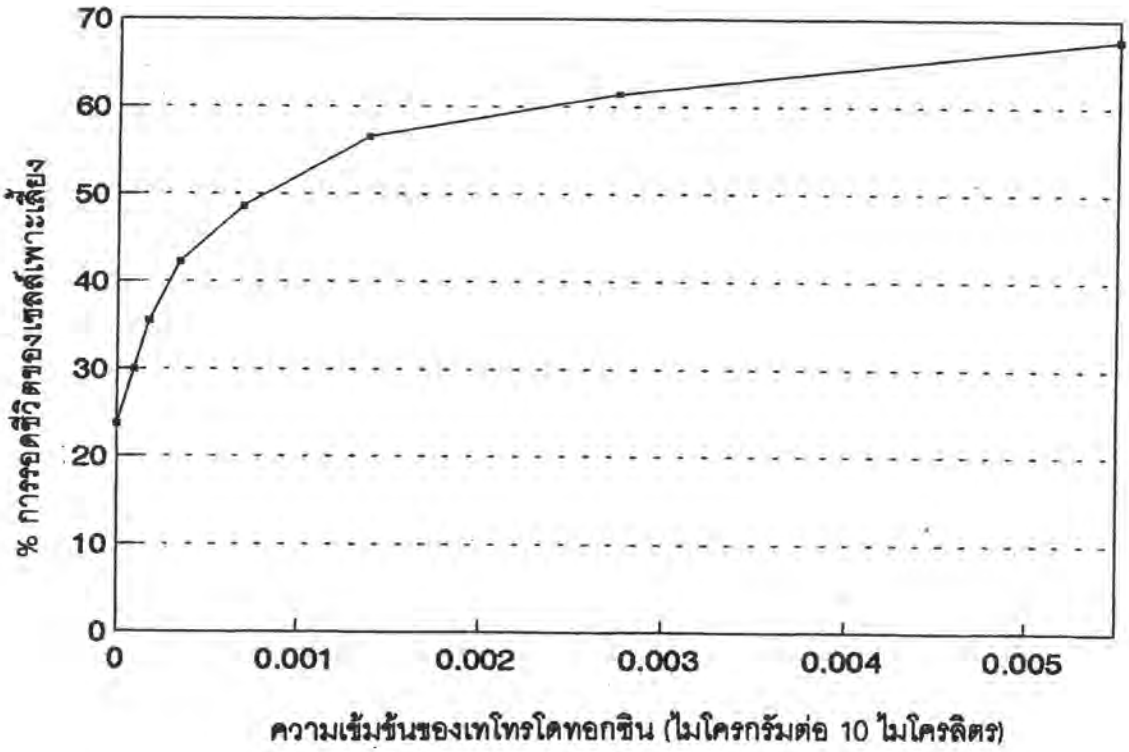
ดูดแกลเชียลอะซิติคแอซิดปริมาตร 0.29 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตรเติมน้ำกลั่นสองครังจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่นำมาใช้ในการเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเอชพีแอลซี ทั้งหมดเป็นสารเคมีในระดับ HPLC grade หรือระดับ

analytical reagent grade และสารละลายที่เตรียมได้นั้น ก่อนนำมาใช้ต้องนำมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีความกว้างของช่องขนาด 0.45 ไมครอน และต้องกำจัดฟองอากาศ (degas) ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงออกก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

ภาคผนวก ค.

1. กราฟมาตรฐานของสารเทโทรโดทอกซินที่ใช้หาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture assay)

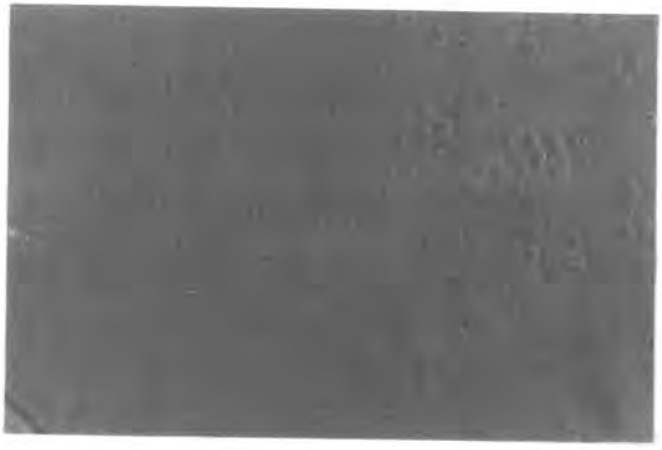


รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตกับปริมาณเทโทรโดทอกซิน (ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

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

(1)

(2)



รูปที่ 25. ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ phase contrast กำลังขยาย 500 เท่า

(1) ลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิต

(2) ลักษณะของเซลล์ที่ตาย

3. การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมบริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์

สารตัวอย่างที่สกัดได้ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหาอนุพันธุ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารพิษ โดยวิธีเอช พี แอล ซี จะนำสารมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยการนำมาผ่านคอลัมน์สำเร็จรูปเซพแพค 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. และน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตรประมาณ 15 มล. ตามลำดับ

3.2 การทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์เซพแพค ซี 18

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

4. หอยทราย

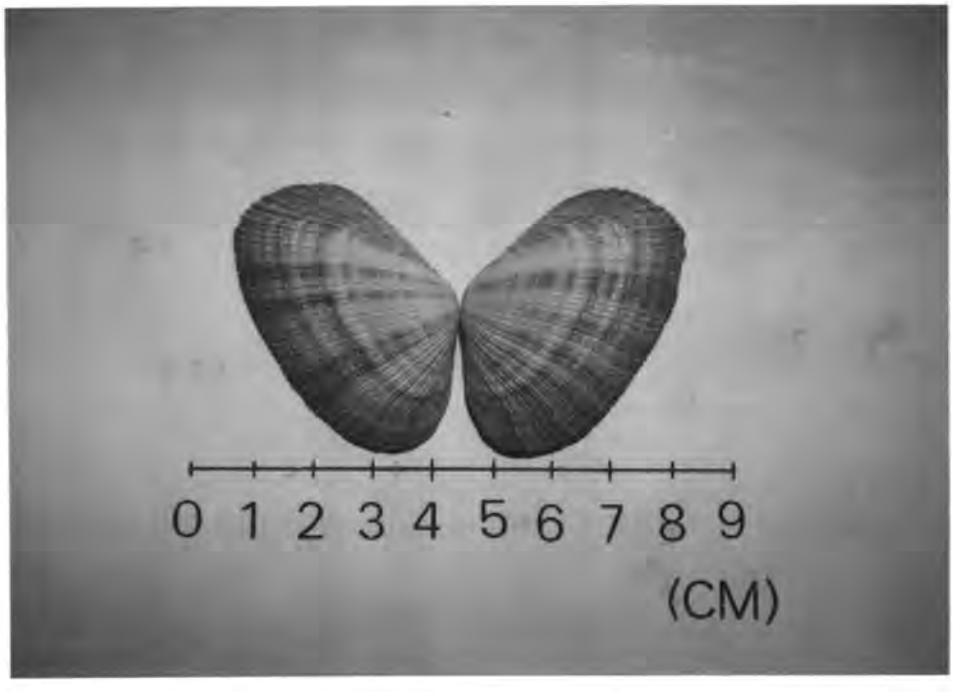
Kingdom	Animalia
Sub Kingdom	Invertebrata
Phylum	Mollusca
Class	Pelecypoda
Family	Veneridae

Genus *Asaphis*

Species *Asaphis violascens*

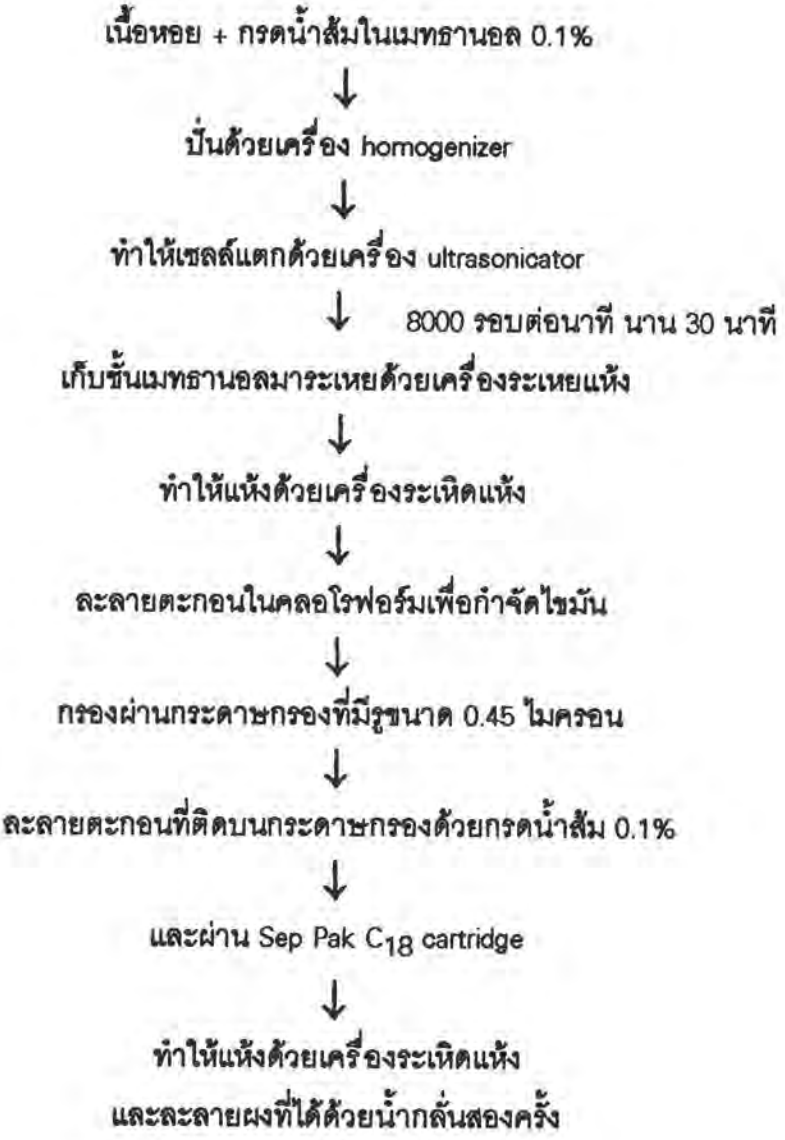
ชื่อสามัญ sand clam

หอยทรายเป็นหอยสองฝา เปลือกค่อนข้างแบน ผิวเปลือกมีลายเป็นสันถี่ และมีรอยหยักบนสัน เปลือกมีสีขาวปนม่วง (รูปที่ 26.) ขนาดที่พบตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ คือมีความกว้างประมาณ 2.5-3.5 ซม. และมีความยาว 4.0-5.5 ซม. มีการกินอาหารแบบ filter feeding หรือการกรองและพบทั่วไปตามพื้นทะเลที่เป็นทรายหยาบหรือทรายปนโคลน หอยทรายเป็นหอยที่พบว่ามีสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยพบทั้งสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน และสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ดังนั้นจึงไม่นิยมนำมาบริโภคและพบว่าหอยทรายมีระดับความเป็นพิษไม่คงที่ในรอบปี กล่าวคือ ในระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายนมีระดับความเป็นพิษสูง ส่วนระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคมมีระดับความเป็นพิษต่ำ (Saitanu et al., 1992) พบว่าแบคทีเรียสร้างพิษในหอยทรายระยะพิษสูงมีจำนวนสูงกว่าในหอยทรายระยะพิษต่ำ (Juntongjin et al., 1996)

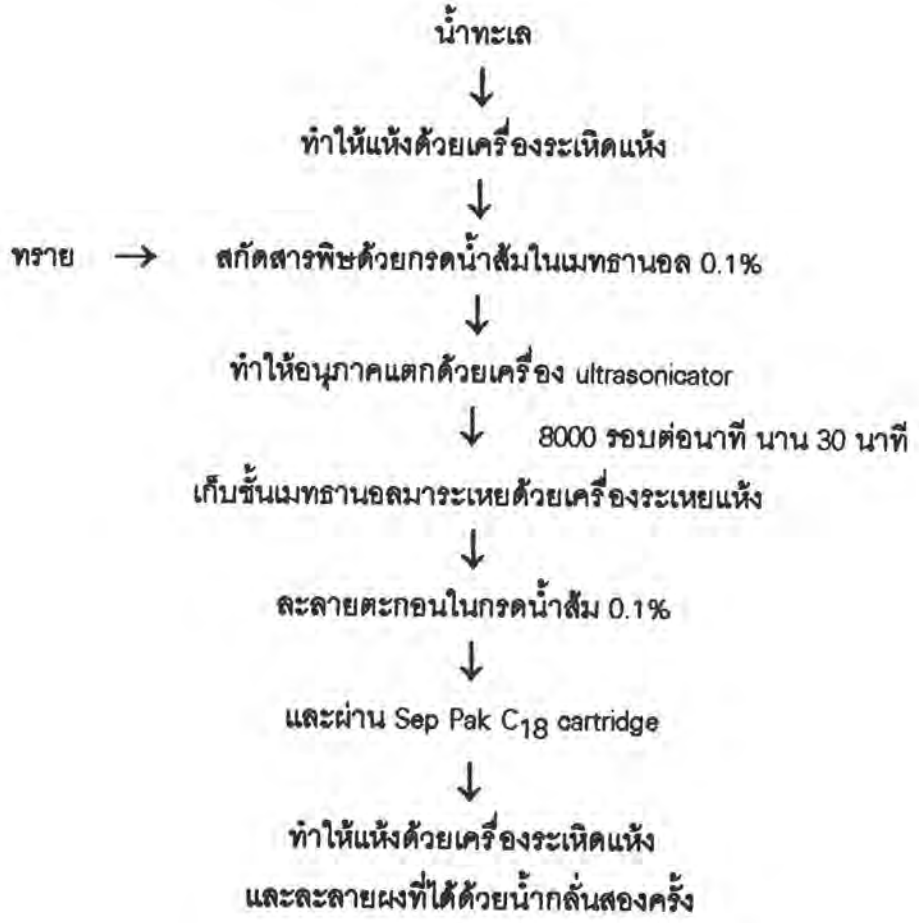


รูปที่ 26 หอยทราย (sand clam; *Asaphis violascens)*

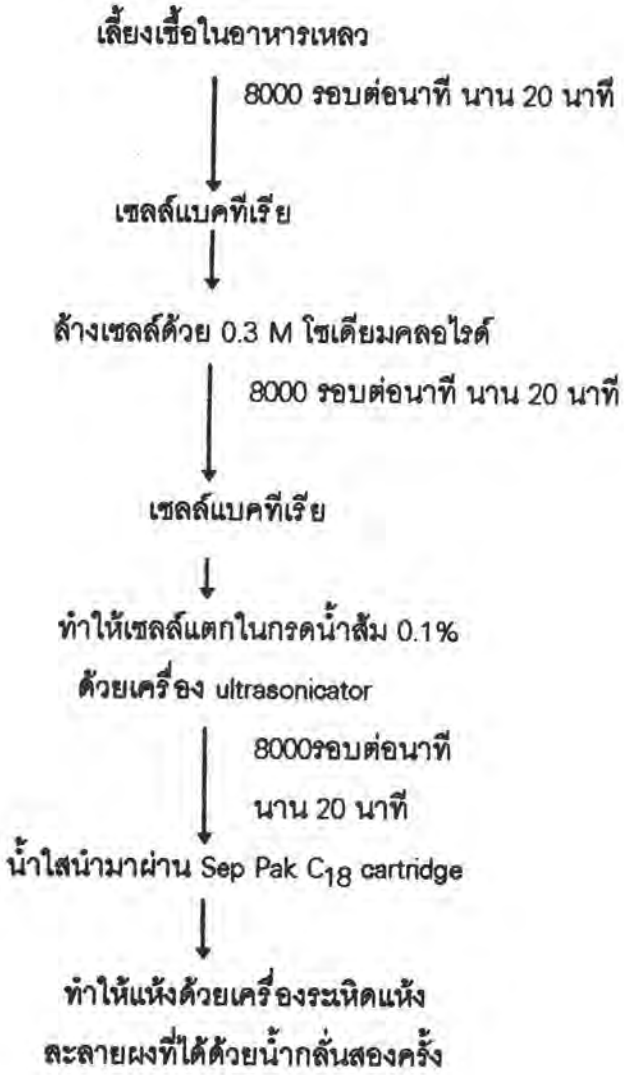
5. แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารพิษจากเนื้อหอยสองฝา สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



6. แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารพิษจากทราย และน้ำทะล สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



7. แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารพิษจากภายในเซลล์ของแบคทีเรีย สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



8. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Varience, ANOVA) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบภายหลัง(Duncans multiple range test)โดยใช้โปรแกรมทางสถิติคือ Statgrapics

Multiple range analysis for HIFOOD.day1 by HIFOOD.group

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	3	.0195330	*
2	3	.0220363	*
5	3	.0242967	*
4	3	.0566300	*
1	3	.0603197	*

Multiple range analysis for HIFOOD.day2 by HIFOOD.group

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	3	.0137360	*
2	3	.0170310	*
5	3	.0183183	*
1	3	.0649230	*
4	3	.0659167	*

Multiple range analysis for HIFOOD.day3 by HIFOOD.group

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	.0123303	*
3	3	.0134443	*
5	3	.0155137	*
4	3	.0575287	*
1	3	.0614393	*

Multiple range analysis for HIFOOD.day4 by HIFOOD.group

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	.0119217	*
3	3	.0131723	*
5	3	.0134227	*
4	3	.0323927	*
1	3	.0446063	*

Multiple range analysis for HIFOOD.day5 by HIFOOD.group

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	3	.0103317	*
2	3	.0117907	*
5	3	.0125313	*
4	3	.0291703	*
1	3	.0307683	*

Multiple range analysis for HIFOOD.day6 by HIFOOD.group

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	3	.0089947	*
2	3	.0111303	*
5	3	.0122523	*
4	3	.0258877	*
1	3	.0284557	*

Multiple range analysis for HIFOOD.day7 by HIFOOD.group

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	3	.0088937	*
5	3	.0106450	*
2	3	.0110837	*
4	3	.0207783	*
1	3	.0258283	*

Multiple range analysis for HIFOOD.day8 by HIFOOD.group

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	3	.0083023	*
2	3	.0088700	*
5	3	.0094457	*
1	3	.0174320	*
4	3	.0174697	*

Multiple range analysis for LOWTOXIN.baclow by LOWTOXIN.day

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
0	3	.0016013	*
8	3	.0138647	*
7	3	.0152060	**
6	3	.0169153	**
5	3	.0190467	*
4	3	.0198340	*
3	3	.0258947	*
1	3	.0278557	**
2	3	.0314090	*

One-Way Analysis of Variance

Data: AMINO.asp

Level codes: AMINO.group

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 95 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	73.702225	1	73.702225	30.037	.0317
Within groups	4.907450	2	2.453725		
Total (corrected)	78.609675	3			

0 missing value(s) have been excluded.

One-Way Analysis of Variance

Data: AMINO.THR

Level codes: AMINO.group

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 95 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	91.968100	1	91.968100	26.241	.0361
Within groups	7.009600	2	3.504800		
Total (corrected)	98.977700	3			

0 missing value(s) have been excluded.

One-Way Analysis of Variance

Data: AMINO.HIS

Level codes: AMINO.group

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 95 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	66.830625	1	66.830625	73.350	.0134
Within groups	1.822250	2	.911125		
Total (corrected)	68.652875	3			

0 missing value(s) have been excluded.

One-Way Analysis of Variance

Data: AMINO.ASN

Level codes: AMINO.group

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 95 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	29.052100	1	29.052100	999.999	.0001
Within groups	.003400	2	.001700		
Total (corrected)	29.055500	3			

0 missing value(s) have been excluded.

ประวัติผู้เขียน

นางสาววรพรรณี พจนสุนทร เกิดเมื่อวันที่ 24 พฤษภาคม พ.ศ.2515 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร และได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ในปีการศึกษา 2535 และเข้ารับการศึกษาต่อในชั้นปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2536 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์แห่งชาติ (สวทช.) ในปีการศึกษา 2537 ที่อยู่ปัจจุบัน 23/77 หมู่บ้านสมุทรนิเวศน์ ตำบลบางเมือง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ 10270