บทที่ 2

บทวารสารปริทัศน์

สารกีดขวางช่องโซเดียม (sodium channel blockers) เป็นสารพิษกลุ่มหนึ่ง ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลน้อย มีคุณสมบัติเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีนและมีผลต่อระบบประสาท (nonpeptidic neurotoxin) โดยมีกลไกอย่างจำเพาะในการกีดขวางการผ่านเข้าออกของโซเดียมอิออน (Na^+) ทางช่องโซเดียมบริเวณเยื่อหุ้มส่วนแอกซอนของเซลล์ประสาท (Bower et al., 1981) ยับยั้งการเกิดกระบวนการดีโพลาไรเซชั่น (depolarization) ในการเกิดกระแสประสาท ซึ่งตามปกติเมื่อเนื้อเยื่อของเซลล์ประสาทถูกกระตุ้น โซเดียมอิออนจากภายนอกเซลล์จะผ่านเข้าไปภายในเซลล์ ทำให้เกิดความต่างศักย์ทางไฟฟ้าขึ้นระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดกระแสประสาทส่งผ่านไปตามเส้นประสาท ในส่วนของกล้ามเนื้อจะทำให้กล้ามเนื้อหดตัว ในกรณีที่ได้รับสารพิษชนิดนี้ สารจะไปปิดกั้นช่องโซเดียมทำให้โซเดียมอิออนผ่านเข้าไปในเซลล์ไม่ได้ จึงไม่เกิดการส่งผ่านของกระแสประสาท เกิดอาการชาที่ปลายประสาท กล้ามเนื้อไม่ทำงาน ถ้าได้รับปริมาณมากอาจเกิดอัมพาตและเสียชีวิตได้ (Kao and Levinson, 1986)

สารกีดขวางช่องโซเดียมประกอบด้วยสารหลายกลุ่ม แต่ที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก ได้แก่ สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxins, TTXs) และสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poisons, PSPs) ซึ่งสารพิษแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยหลายอนุพันธ์ และมีความเป็นพิษมากน้อยต่างกันไป

สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxins, TTXs)

ก. ประวัติความเป็นมา

เทโทรโดทอกซินพบครั้งแรกในปลาวงศ์ Tetraodontiformes ซึ่งเป็นปลาจำพวกปลาปักเป้า (puffer fish) เมื่อปี ค.ศ. 1964 (Tsuda et al., 1964) ต่อมาพบเทโทรโดทอกซินหรือทาริคาทอกซิน (tarichatoxin) ใน California newts (*Taricha torosa*) (Mosher et al., 1964) และยังพบในสัตว์ชนิดอื่นๆอีกได้แก่ ปลาบู่ (*Gobius criniger*) (Noguchi and Hashimoto, 1973) , กบ (*Atelopus chiriquiensis*) (Kim et al., 1975; Pavelka, Kim and Mosher, 1977) ,

คางคก (*Atelopus oxyrhynchus*) (Yamashita, Mebs and Yasumoto, 1992) นอกจากนั้นยังพบในสัตว์ทะเลหลายชนิดได้แก่ ปู (Xanthid crab; *Atergaris floridus*) (Noguchi et al., 1984)และหมึกยักษ์ (blue-ringed octopus; *Hapalochlaena maculosa*) (Sheumack et al., 1978) ในประเทศไทยพบว่ามีเทโทรโดทอกซินในแมงดาทะเล (horseshoecrab; *Carcinoscorpius rotundicauda*) (Kungsuwan et al., 1988) และปลาปักเป้าน้ำจืดสกุล Tetraodon 2 สายพันธุ์ คือ *Tetraodon fangi* (Laobhripatr et al., 1990) และ *T. palembangensis* (Saitanu et al., 1991)

จากการศึกษาต่อมาพบว่า แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ เช่น *Pseudomonas* sp. (Yasumoto et al., 1986; Yotsu et al., 1987), *Vibrio alginolyticus* (Kungsuwan et al., 1988), *Bacillus* sp. , *Micrococcus* sp. , *Moraxella* sp. , *Vibrio* sp. , *Actinetobacter* sp. , *Aeromonas* sp. , *Alcaligenes* sp. , *Alteromonas* sp. ,*Flavobacterium* sp. , *Caulobacter* sp. , *Actinomycetes* sp. (Do et al., 1993), *Vibrio* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Juntongjin et al., 1993)

ข. สมบัติของสาร

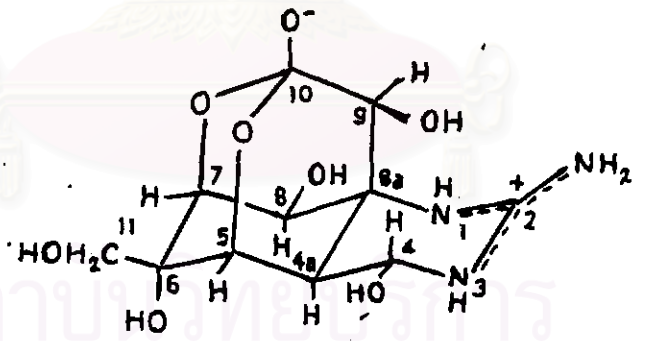
สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซินมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ พิษปลาปักเป้า (puffer fish poison), ทาริคาทอกซิน (tarichatoxin), มาคูโลทอกซิน (maculotoxin) และสเฟียรอยดีน (spheroidine) เป็นต้น โดยสารกลุ่มนี้มีสมบัติดังนี้

สูตรโมเลกุล	:	$C_{11}H_{17}N_3O_8$ (Evans, 1972)
น้ำหนักโมเลกุล	:	319.28 (Evans, 1972)
โครงสร้างโมเลกุล	:	ประกอบด้วย คาร์บอน 41.38 % ไฮโดรเจน 5.37% ไนโตรเจน 13.16% และออกซิเจน 40.09%(Budsvari et al.,1989)
ค่าคงที่ของการแตกตัว	:	ในน้ำ 8.84 และใน 50% เอทธานอล 9.54
การละลาย	:	ละลายได้ดีในกรดอะซิติกเจือจาง ละลายได้บางส่วนในน้ำ แอลกอฮอล์และอีเทอร์ ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อื่น
ความเสถียร	:	ถูกทำลายได้ในกรดแก่และด่าง
ความเป็นพิษ	:	ค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนู (mice) คือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่าLD_{50} เมื่อให้หนูกิน มีค่า 322 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Evans, 1972)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

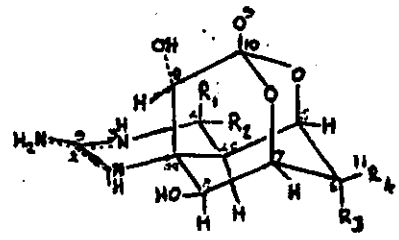
สารกลุ่มเทโทรโดทอกซินมีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลแบบเฉพาะตัว (unique structure) ซึ่งไม่พบในสารประกอบชนิดอื่นๆ โดยมีโครงสร้างแบบ iminoperhydroquinazoline ประกอบด้วยหมู่กัวนิดิเนียม (guanidinium) 1 หมู่และพันธะเฮมิแลคตัล (hemilactal linkage) ดังแสดงโครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในรูปที่1

ปัจจุบันพบอนุพันธ์ของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซินมากกว่า 13 อนุพันธ์ แต่ที่ศึกษากันมากมี 4 อนุพันธ์ คือ เทโทรโดทอกซิน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมาคือ 4-อีพิเทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน ตามลำดับ ส่วนเทโทรโดนิกแอซิดไม่มีความเป็นพิษ (Nagamura and Yasumoto, 1985) โดยแต่ละอนุพันธ์มีความแตกต่างกันตรงบริเวณหมู่ข้างเคียง (side-chain group) โดยมีจำนวน 4 หมู่ คือ R_1-R_4 ดังแสดงโครงสร้างอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินในตารางที่ 1

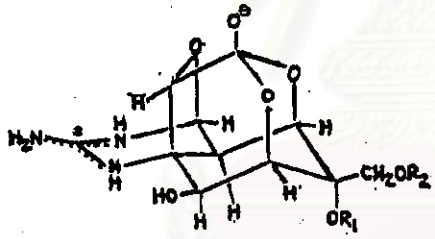


รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซิน

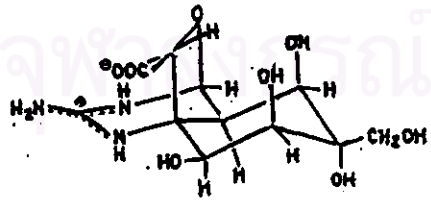
(Kao and Welker, 1982)



derivative	R_1	R_2	R_3	R_4
tetrodotoxin	H	OH	OH	CH_2OH
deoxytetrodotoxin	H	H	OH	CH_2OH
methoxytetrodotoxin	H	OCH_3	OH	CH_2OH
ethoxytetrodotoxin	H	$O(C_2H_4)$	OH	CH_2OH
tetrodaminotoxin	H	NH_2	OH	CH_2OH
4-epi tetrodotoxin	OH	H	OH	CH_2OH
6-epi tetrodotoxin	H	OH	CH_2OH	OH
11-deoxy tetrodotoxin	H	OH	OH	CH_3
11-oxo tetrodotoxin	H	OH	OH	$CH(OH)_2$



anhydrotetrodotoxin	H	H
11-monoformylanhydrotetrodotoxin	H	HCO
6,11-diacetylanhydrotetrodotoxin	CH_2CO	CH_2CO



tetrodonic acid

ตารางที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน

(Narahashi, Moore and Poeten, 1967)

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poisons, PSPs)

ก. ประวัติความเป็นมา

พบครั้งแรกในหอยกาบ (butter clam ; *Saxidomus giganteus*) (Kao and Nishiyama, 1965) ต่อมาพบในไดโนแฟลกเจลเลตสกุล Protogonyaulax (Proctor et al., 1975) ภายหลังเปลี่ยนชื่อสกุลเป็น Alexandrium (Shimizu et al., 1990) ซึ่งได้พบว่า *A. tamarense, A.catenella* (Harada, Oshima and Yasumoto, 1982) สามารถสร้างสารพิษกลุ่มนี้ได้ และยังพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) (Kodama, Noguchi et al., 1983) นอกจากนั้นยังพบสารพิษชนิดนี้ในสัตว์ทะเลอีกหลายชนิด ได้แก่ หอยแมลงภู่ (*Mytilus* sp.) (Shimizu et al., 1973), หอยกาบ (soft shell clam; *Mya arenaria*) (Shimizu et al., 1975) อีกทั้งยังพบในปลาปักเป้าชนิดที่มีพิษ (*Takifugu pardalis*) (Kodama, Ogata et al., 1983)และมีรายงานว่าพบสารพิษชนิดนี้ในปลาปักเป้าน้ำจืดบางชนิด เช่น *T. cutcutia* และ *Chelonodon patoca* (Zaman et al., 1997), *T. fangi* (Sato et al., 1997)

ต่อมา Kodama และ Ogata (1988) ได้ตั้งสมมุติฐานว่าแบคทีเรียทำให้เกิดพิษในไดโนแฟลกเจลเลต *A. tamarensis* จึงทำภาคตัดขวาง (section) ของ *A. tamarensis* และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน พบเซลล์แบคทีเรียภายในเซลล์ของไดโนแฟลกเจลเลตที่มีพิษ ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Moraxella* sp.

Juntongjin และคณะ (1996) ได้แยกแบคทีเรียจากหอยทรายที่มีพิษ(*Asaphis violascens*) ที่สามารถสร้างสารพิษได้ทั้งกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยและกลุ่มเทโทรโดทอกซินตรวจสอบพบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp.

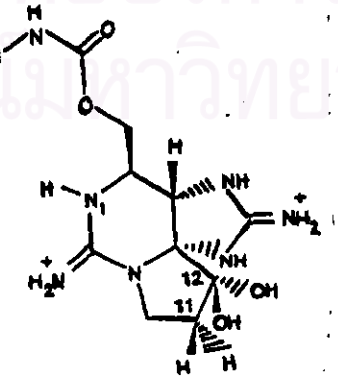
ข. สมบัติของสาร

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยมีชื่อสามัญต่างๆ ได้แก่ mussel poison, clam poison, gonyaulax toxin และ paralytic shellfish poison เป็นต้น สารกลุ่มนี้ประกอบด้วยอนุพันธ์ที่สำคัญสองกลุ่ม คือ อนุพันธ์กลุ่มซัคซิทอกซิน (saxitoxins, STXs) และอนุพันธ์กลุ่มกอนิออทอกซิน (gonyautoxins, GTXs) โดยใช้อนุพันธ์ซัคซิทอกซินเป็นตัวแทนสารกลุ่มนี้

สมบัติของอนุพันธ์ซัคซิทอกซินมีดังนี้

สูตรโมเลกุล	: $C_{10}H_{17}N_7O_4$ (Evans, 1972)
น้ำหนักโมเลกุล	: 299.30
ค่าคงที่ของการแตกตัว	: ในน้ำมีค่า 8.25 และ 11.60 (Kao, 1986)
การละลาย	: ละลายได้ในน้ำและเมทธานอล ละลายได้บางส่วนในเอทธานอลและกรดอะซิติกเข้มข้น (gracial acetic acid) ไม่ละลายในตัวทำละลายไขมัน
ความเสถียร	: เสถียรในสารละลายกรดแต่ถูกทำลายอย่างรวดเร็วในสารละลายด่าง และเมื่อนำไปต้มในน้ำที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.0 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงจะเสียสภาพ(Evans, 1972)
ความเป็นพิษ	: ค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าท้องหนู (mice) คือ10 µgต่อกิโลกรัม เมื่อฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำของหนูคือ 3.4 µgต่อกิโลกรัม และเมื่อให้หนูกิน คือ 263 µgต่อกิโลกรัม (Budavari et al., 1989)

โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน ประกอบด้วยหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่ แต่ละหมู่เชื่อมกันด้วยพันธะอาซาคีตัล (azaketal linkage)ที่เสถียร ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่ไม่พบในสารประกอบธรรมชาติชนิดอื่นๆ (Bower et al., 1981) และมีหน้าที่เข้าไปจับกับช่องโซเดียม (Kao, 1986) โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซินแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2. โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน

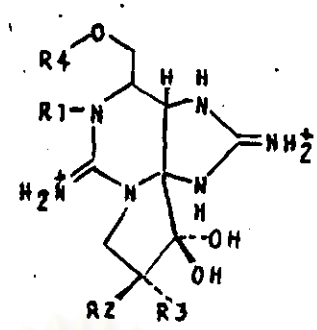
(Stafford and Hines, 1995)

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยทั้งสองกลุ่มดังกล่าวยังประกอบด้วยอนุพันธ์ย่อยต่างๆได้แก่

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

- สารกลุ่มกอนิออทอกซิน (GTXs) ประกอบด้วยกอนิออทอกซิน1 (GTX1), GTX2, GTX3, GTX4, GTX5, GTX6, GTX8 หรือ C1, epi GTX8 และ C2 โดย GTX3 มีความเป็นพิษสูงสุด รองลงมาคือ STX และ GTX1 ส่วน GTX5, GTX6 และ GTX8 มีความเป็นพิษต่ำ (Oshima et al., 1987) การที่แต่ละอนุพันธ์มีความเป็นพิษต่างกันและทำให้มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมต่างกันขึ้นอยู่กับหมู่ข้างเคียง ซึ่งมี 4หมู่ คือ R1- R4 ดังแสดงโครงสร้างและความเป็นพิษจำเพาะของอนุพันธ์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยในตารางที่ 2.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



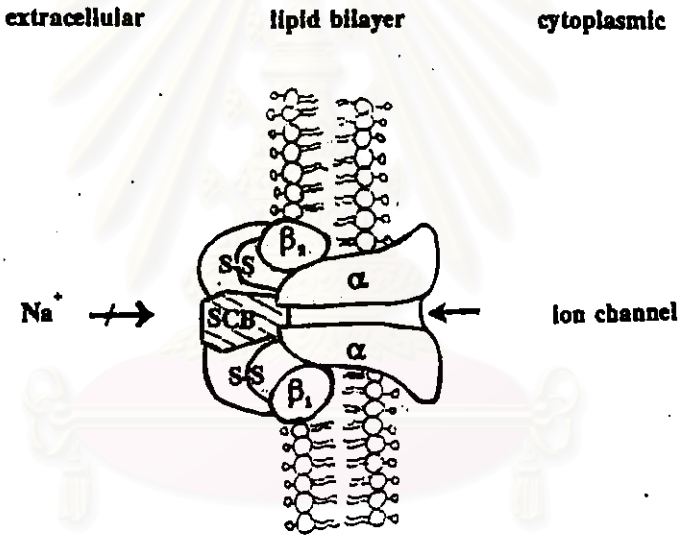
derivative	R_1	R_2	R_3	R_4	specific toxicity (MU/umol)
saxitoxin	H	H	H	$CONH_2$	2480
neosaxitoxin	OH	H	H	$CONH_2$	2300
decarbamoylsaxitoxin	H	H	H	H	-
decarbamoylneosaxitoxin	OH	H	H	H	-
GTX1	OH	H	OSO_3^-	$CONH_2$	2470
GTX2	H	H	OSO_3^-	$CONH_2$	890
GTX3	H	OSO_3^-	H	$CONH_2$	1580
GTX4	OH	OSO_3^-	H	$CONH_2$	1800
dcGTX1	OH	H	OSO_3^-	H	-
dcGTX2	H	H	OSO_3^-	H	380
dcGTX3	H	OSO_3^-	H	H	940
dcGTX4	OH	OSO_3^-	H	H	-
GTX5 (B1)	H	H	H	$CONHSO_3^-$	-
GTX6 (B2)	OH	H	H	$CONHSO_3^-$	-
epiGTX6 (C1)	H	H	OSO_3^-	$CONHSO_3^-$	15
GTX8 (C2)	H	OSO_3^-	H	$CONHSO_3^-$	240
C3	OH	H	OSO_3^-	$CONHSO_3^-$	-
C4	OH	OSO_3^-	H	$CONHSO_3^-$	-

ตารางที่ 2. โครงสร้างสูตรโมเลกุลและความเป็นพิษจำเพาะของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอย

(Oshima,Bolch and Hallegraeff, 1992)

กลไกทางชีวภาพของสารกีดขวางช่องโซเดียม

หมู่กัวนิดิเนียมภายในโครงสร้างของสารกีดขวางช่องโซเดียมจะเข้าไปจับกับช่องโซเดียมอย่างจำเพาะตรงบริเวณเยื่อหุ้มแอกซอนของเซลล์ประสาท (Kao, 1986) ซึ่งช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทหนูประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) 3 subunit คือ α , β_1 และ β_2 subunit โดย α และ β_2 subunit จะจับกันด้วย disulfide bonds ในขณะที่ β_1 subunit จะจับกับโมเลกุลอื่นๆด้วยพันธะ noncovalent ดังแสดงภาพจำลองโครงสร้างของช่องโซเดียมเมื่อถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียมในรูปที่ 3



รูปที่ 3. โครงสร้างของช่องโซเดียมที่ถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bower และคณะ (1981) ศึกษาพบว่า หมู่กัวนิดิเนียมที่มีประจุบวก (cationic charges) จะจับกับประจุลบของออกซิเจน (anionic charges)ที่อยู่บริเวณช่องโซเดียมของเซลล์ประสาท โดยแรงดึงดูดทางไฟฟ้า และเนื่องจากโมเลกุลมีขนาดใหญ่จึงผ่านเข้าไปไม่ได้ รวมทั้งเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลกับออกซิเจนที่อยู่บนบริเวณจำเพาะของช่องโซเดียม จึงทำให้เกิดกลไกการกีดขวางขึ้น

Kao และ Walker (1982) พบว่าหมู่กัวนิดิเนียมของเทโทรโดทอกซินที่เข้าไปจับกับช่องโซเดียม เกิดบริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ของคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4, 8, 9 และ 10 ของโมเลกุล ส่วนหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่ของซัคซิทอกซินอาจเข้าไปจับกับช่องโซเดียม 1 หมู่ หรือ 2 หมู่ โดยหมู่กัวนิดิเนียมที่จับกับช่องโซเดียม คือ คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7, 8, 9 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 12 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการจับระหว่างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมกับช่องโซเดียมแต่ละอนุพันธ์มีความแตกต่างกัน จึงมีผลให้กลไกในการออกฤทธิ์ของสารแตกต่างกันด้วย

ประโยชน์ของสารกีดขวางช่องโซเดียม

สารกีดขวางช่องโซเดียมทั้งสองกลุ่มมักทำให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขจากการที่มีผู้นำเอาสัตว์ทะเลที่มีพิษมาบริโภค แต่เนื่องจากสารทั้งสองกลุ่มมีสมบัติทางเภสัชวิทยาและทางเคมีคล้ายคลึงกัน (Kodama et al., 1983) รวมทั้งสารชนิดนี้มีคุณสมบัติในการจับอย่างจำเพาะต่อช่องโซเดียม จึงได้มีการนำเอาสารกีดขวางช่องโซเดียมมาใช้ประโยชน์ในด้านประสาทสรีรวิทยา (neurophysiology) และประสาทเภสัชวิทยา (neuropharmacology) เช่นใช้ในการนับจำนวนช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทและกล้ามเนื้อของสัตว์ชนิดต่างๆ โดยการจับของสารกับช่องโซเดียมเป็นแบบหนึ่งต่อหนึ่ง และนำมาใช้ในการศึกษาปรากฏการณ์การถูกกระตุ้นของเซลล์ประสาทและเนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้ยังมีการนำเอาสารประเภทนี้ไปทดลองใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic drug) ที่มีความจำเพาะสูง (Kao and Nishiyama, 1965)

Juntongjin และคณะ (1993) ได้แยก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 จากหอยทราย (sand clam; *Asaphis violascens*)บริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูง และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มไว้ที่ 27 °C เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์และสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากเซลล์แบคทีเรีย ผลการตรวจสอบสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธี เอช พี แอล ซี (HPLC) พบสาร

ที่คล้ายอนุพันธ์กลุ่ม PSPs และ TTXs ซึ่งเป็นรายงานแรกที่พบแบคทีเรียชนิดที่สามารถสร้างสารได้ทั้งสองกลุ่ม และเป็นอนุพันธ์ที่คล้ายกับที่พบในหอยทราย จึงสันนิษฐานว่า แบคทีเรียชนิดนี้อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพิษในหอยทราย รวมทั้งอาจมีกลไกการสร้างสารพิษร่วมกัน

ดังนั้นเพื่อศึกษาสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างจากแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 จึงต้องมีการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนต่างๆ เพื่อให้การศึกษาสมบัติของสารทำได้ง่ายและให้ความละเอียดเพิ่มขึ้น

รายงานการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์

รายงานที่ศึกษาการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์ ส่วนใหญ่มีรายงานที่ทำจากสัตว์ ดังนี้

วิธีโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

Sheumack และ Howden (1978) ได้แยก maculotoxin จากปลาหมึกยักษ์ (*Hapalochlae maculosa*) ได้สารพิษที่มีความเป็นพิษ 2 MU/ mg ผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (CM-Sephadex C-25)แบบแอมโมเนียมอิออน (NH_4^+ form)ได้สารพิษมีความเป็นพิษ 70 MU/mg และได้นำสารพิษไปผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 ซ้ำอีก 3 ครั้ง พบว่าได้สารพิษมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3500 เท่า ศึกษาสมบัติด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (thin-layer chromatography ,TLC) และ เอช พี แอล ซี (HPLC) พบว่าเป็นเทโทรโดทอกซิน

เทคนิคการดูดซับ (adsorption) และโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

Narita และคณะ (1981) แยก boshubora toxin (BST) จาก trumpet Shell (Boshubora; *Charonia sauliae*)ได้ปริมาณสารพิษรวม 90000 MU โดยดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย แอมเบอร์ไลต์ ไอ อาร์ ซี 50 (Amberlite IRC-50) นำส่วนที่ชะออกมาดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์อีกครั้ง แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 ศึกษาสมบัติของผลึกสารพิษด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (TLC), อิเลกโทรโฟริซิส

(electrophoresis) , ไออาร์ สเปกตรัม (IR spectrum), เอ็นเอ็มอาร์ (H-NMR spectrum) และจีซี เอ็มเอส(GC-MS) พบว่าเป็นเทโทรโดทอกซินซึ่งมีความเป็นพิษ 3700 MU/mg

Noguchi และคณะ (1984) แยกเทโทรโดทอกซิน จาก frog shell (*Tutufa lissostoma*) รวมปริมาณสารพิษ 15000 MU นำไปผ่านคอลัมน์แอมเบอร์ไลต์ ไออาร์ซี 50 แบบแอมโมเนียมอิออน ขนาด2.6 x 29 ซม. ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นและชะด้วยกรดน้ำส้มเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ เก็บส่วนที่มีพิษทั้งหมดได้ 14000 MU ไปดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ ชะสารพิษออกจากผงถ่านด้วยกรดน้ำส้มเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ในเอทธานอลเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ เหลือปริมาณสารพิษ 10000 MU นำผงสารพิษมาละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6 และผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 แบบแอมโมเนียมอิออน ขนาด 1.6 x 94 ซม. ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของ สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 ถึง 0.4 โมลาร์ pH 6 เก็บส่วนที่มีพิษทั้งหมด 8000 MU นำไปผ่านคอลัมน์ไบโอเร็กซ์ 70 (Bio-Rex 70) แบบไฮโดรเจนอิออน (H^+ form) ขนาด 0.8 x 95 ซม. ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0 ถึง 0.3 โมลาร์ เหลือสารพิษที่มีปริมาณสารพิษรวม 5900 MU เหลือผลผลิต 39.33 เปอร์เซนต์ ศึกษาสมบัติของสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง ,อิเลกโทรโฟริซิส ,GC-MS และเอ็นเอ็มอาร์ สเปกโทรสโคพี (H-NMR spectroscopy)

เทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel-filtration chromatography)

Hwang, Chueh and Jeng (1990) แยกสารพิษจาก gastropod mollusk (lined moon shell; *Natica lineata*) ได้ปริมาณรวม 4500 MU ทำให้บริสุทธิ์โดยการกรองแบบอัลตร้าฟิลเตรชันผ่านแผ่นกรอง Diaflo YM-2 และนำของเหลวที่ได้จากการกรองไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (Bio-Gel P-2) ชะด้วยสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ได้สารพิษที่มีความเป็นพิษ 620 MU/mg ศึกษาสมบัติด้วยวิธี อิเลกโทรโฟริซิส และ เอช พี แอล ซี พบว่าเป็นอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน

เทคนิคเจลฟิลเตรชันและแลกเปลี่ยนประจุ

Miyazawa และคณะ (1986) แยกสารพิษจากหนอนตัวกลม (flatworm ; *Planocera multitentaculata*) ทำให้บริสุทธิ์โดยกรองแบบอัลตร้าฟิลเตรชั่นผ่านแผ่นกรอง Diaflo YM-2 ได้ปริมาณสารพิษรวม 5100 MU จากนั้นผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ขนาด 6 x 60 ซม. ชะด้วยกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เก็บส่วนที่มีพิษหาปริมาณสารพิษได้ 3500 MU และนำไปผ่านคอลัมน์ไบโอเร็กซ์ 70 (Bio-Rex 70) แบบไฮโดรเจนอิออน (H^+ form) ขนาด 0.8 x 94 ซม. ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของกรดน้ำส้มเข้มข้น 0 ถึง 0.3 โมลาร์ เก็บส่วนที่มีพิษไปผ่านคอลัมน์เดิมซ้ำอีกครั้งได้สารพิษที่มีความเป็นพิษ 3500 MU/mg ศึกษาสมบัติด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง, อิเลกโทรโฟริซิส และGC-MS พบว่าเป็นอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน

เทคนิคการดูดซับและเจลฟิลเตรชัน

Noguchi และคณะ (1991) แยกสารพิษจาก ribbon worm (*Cephalothrix linearis*) ได้สารพิษรวม 54800 MU และ flat worm (*Planocera multitentaculata*) ได้สารพิษรวม 23500 MU ทำสารพิษจากทั้งสองแหล่งให้บริสุทธิ์โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ ดูดซับ และชะด้วย กรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ในเอทธานอลเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ ได้สารพิษจาก ribbon worm 28400 MU และจาก flat worm 18400 MU นำสารพิษที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ขนาด 2.0 x 95 ซม. โดยใช้กรดน้ำส้ม 0.03 โมลาร์ เป็นตัวชะ เก็บลำดับส่วน 5 ml ได้สารพิษจาก ribbon worm รวม 3500 MU (คิดเป็นผลผลิต 6.39 เปอร์เซนต์) และจาก flat worm รวม 600 MU (คิดเป็นผลผลิต 2.55 เปอร์เซนต์) ศึกษาสมบัติด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง ,อิเลกโทรโฟริซิส , เอช พี แอล ซี , UV Spectrophotometry, GC-MS, Secondary ion mass spectrometry (SIMS) และ TLC-FABMS พบว่าเป็นสารที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายเทโทรโดนิคแอซิด (tetrodonic acid-like substance) แต่ตลอดเวลาการเก็บรักษาและทดลอง สารนี้จะเปลี่ยนรูปไปเป็นเทโทรโดทอกซินในอัตราที่สูง จึงสันนิษฐานว่าสารนี้อาจเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของเทโทรโดทอกซินก็ได้

เทคนิคการดูดซับ, เจลฟิลเตรชันและแลกเปลี่ยนประจุ

Arakawa และคณะ (1995) แยกสารพิษจากปู (xanthid crab; *Atergatis floridus*) ปริมาณรวม 70000 MU ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ดูดซับ และผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2

ขนาด 5 x 35 ซม. นำสารพิษที่ได้ไปผ่านคอลัมน์เดิมซ้ำอีกครั้งโดยใช้คอลัมน์ขนาด 2 x 50 ซม. ชะด้วยกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์ เก็บลำดับส่วนมีพิษได้ 2 ส่วน คือ B1 (30000 MU) และ B2 (15000 MU) ต่อจากนั้นนำส่วน B1 ไปผ่านคอลัมน์ไบโอเร็กซ์ 70 แบบไฮโดรเจนอิออน ขนาด 0.8 x 100 ซม. ได้ส่วนที่มีพิษ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ถูกชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0 ถึง 0.03 โมลาร์ คือ B1- a (12000 MU) และส่วนที่ถูกชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 ถึง 1 โมลาร์ คือ B1- b (13000 MU) ต่อมาได้นำส่วน B1- b ไปผ่านคอลัมน์ไบโอเร็กซ์ 70 แบบไฮโดรเจนอิออน ซ้ำอีก 2 ครั้ง ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0 ถึง 0.07 โมลาร์ และนำไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ใช้สารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์ เป็นตัวชะ ได้สารพิษจากส่วนนี้ทั้งหมด 9000 MU เมื่อศึกษาสมบัติของสารด้วยวิธี HPLC พบว่า ส่วน B1- a ประกอบด้วยเทโทรโดทอกซิน และ B2 คือ นีโอซัคซิทอกซิน, ดีคาร์บาโมอิลซัคซิทอกซินและ ซัคซิทอกซิน และส่วน B1- b เป็นสารพิษที่ไม่ทราบชนิด

นอกจากนั้นในปี ค.ศ. 1992 Shiomi และคณะ (1992) ได้ศึกษาพบว่าของเหลวภายในลำตัว (body fluid) ของปู (shore crab; *Hemigrapsus sanguineus*) มีคุณสมบัติเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่สามารถจับและทำลายฤทธิ์เทโทโดทอกซิน (tetrodotoxin-binding high molecular weight substances) ได้ แต่ไม่เกิดกับสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย โดยพบว่าจากการฉีดของเหลวจากภายในลำตัวปูเข้าช่องท้อง(i.p.) หนูทดลองก่อนและหลังฉีดเทโทรโดทอกซิน ของเหลว 1 มล. สามารถทำลายฤทธิ์เทโทรโดทอกซินได้ 3.6 ถึง 4.0 MU และยังพบว่าเมื่อนำสารพิษที่สกัดจากปลาปักเป้า (*Takifugu niphobles*) ผสมกับของเหลวชนิดดังกล่าวมาผ่านคอลัมน์เซฟาโรส 6บี(Sepharose 6B) ขนาด 2 x 50 ซม. ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (ammonium bicarbonate) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ อัตราการไหล 20 มล.ต่อชั่วโมง เก็บลำดับส่วนวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แต่ละส่วนนำไประเหิดแห้ง และสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทธานอลและกรดน้ำส้ม (อัตราส่วน 99 ต่อ 1) ปริมาตร 1 มล. สกัด 3 ครั้ง นำสารที่สกัดได้ไปทำให้แห้งโดยลดความดัน ละลายผงแห้งของสารพิษด้วยกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์ และวิเคราะห์หาเทโทรโดทอกซินโดยวิธี เอช พี แอล ซี พบว่าได้เทโทรโดทอกซินเกือบบริสุทธิ์จากลำดับส่วนที่พบสารโมเลกุลใหญ่ที่สามารถจับเทโทรโดทอกซินได้ (tetrodotoxin-binding high molecular weight substances) ดังนั้นสารจากของเหลวภายในลำตัวปูชนิดนี้อาจนำไปใช้ประโยชน์ในการทำให้เทโทรโดทอกซินจากตัวอย่างมีความบริสุทธิ์

ส่วนรายงานการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์ยังมีน้อย ได้แก่

เทคนิคการดูดซับ

Yasumoto และคณะ (1986) ทดลองเลี้ยง *Pseudomonas* sp. ที่แยกจากสาหร่าย *Jania* sp. ในอาหารเหลว ปริมาตร 12 ลิตร ที่ 25 °ซ เป็นเวลา 12 วัน โดยไม่ให้อากาศ สกัดสารพิษจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ นำสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ผงถ่าน (charcoal column) ขนาด 4 x 34 ซม. หลังจากล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ ชะสารที่ถูกดูดซับด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ในเอทธานอลเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ นำสารพิษที่ได้จากคอลัมน์ไปศึกษาสมบัติด้วยวิธีเอช พี แอล ซี และโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางพบว่าประกอบด้วยอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน และแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน

เทคนิคเจลฟิลเตรชัน

Kungsuwan และคณะ(1988) แยกแบคทีเรีย *Vibrio* spp จากแมงดาทะเล (Thai horseshoe crab; *Carcinoscorpius rotundicauda*) ซึ่งเป็นสัตว์ที่ตรวจพบเทโทรโดทอกซิน นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โอ อาร์ ไอ (ORI medium)ที่ 20 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเก็บเซลล์มาสกัดสารพิษโดยทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่เสียง (ultrasonication) และทำให้แห้ง นำเอาสารพิษที่ได้ละลายในน้ำกลั่น นำมาผ่านแผ่นกรอง Diaflo YM - 2 และผ่านคอลัมน์ ไบโอเจล พี 2 ขนาด 2 x 90 ซม. ชะคอลัมน์ด้วยกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์ เก็บลำดับส่วนละ 10 มล. ตรวจพบสารพิษที่ลำดับส่วนที่ 21 - 40 ศึกษาสมบัติสารด้วยวิธี เอช พี แอล ซี , UV spectrophotometry และ GC-MS พบว่าเป็นอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน

Kodama (1989) ศึกษาสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรีย *Moraxella* sp. ซึ่งแยกจากไดโนแฟลกเจลเลต *Protogonyaulax tamarensis* โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ 25 °ซ เป็นเวลา 168 ซม. สกัดสารพิษจากเซลล์ได้ปริมาณ 300 MU นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ศึกษาสมบัติด้วย เอช พี แอล ซี พบว่า *Moraxella* sp. สร้างสารพิษคือ ซัคซิทอกซิน

เทคนิคการดูดซับ, เจลฟิลเตรชันและแลกเปลี่ยนประจุ

Yotsu และคณะ (1987) แยกแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ได้จากปลาปักเป้า (*Fugu poecilonotus*) นำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เป็นเวลา 6 วัน ที่ 28°ซ และตั้งทิ้งไว้อีก 4 วัน ที่ 25 °ซ สกัดสารพิษจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำสารพิษให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ผงถ่าน ขนาด 4 x 80 ซม. , ไบโอเจล พี 2 ขนาด 2 x 80 ซม., คอลัมน์โตโยเพิร์ล เอช ดับบลิว 40 (Toyopearl HW- 40) ขนาด 1 x 100 ซม. และไบโอเร็กซ์ 70 ขนาด 1 x 35 ซม. สารที่ได้จากคอลัมน์นำไปศึกษาสมบัติโดยวิธี เอช พี แอลซี และ mass spectrum พบว่าเป็นเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซิน

Kodama, Ogata และSato (1988) แยกแบคทีเรียจาก *Protogonyaulax tamarensis* เลี้ยงในอาหารเหลว ที่ 25 °ซ เป็นเวลา 4 วัน และตั้งทิ้งไว้ที่ 4 °ซ อีก 4 วัน สกัดสารพิษจากเซลล์แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ จากเซลล์แบคทีเรียได้สารพิษรวม 20 MU ทำให้บริสุทธิ์โดยการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์และผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 พบว่าวิธีนี้ทำให้สูญเสียสารพิษในแต่ละขั้นตอนมาก และสกัดสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 70 ลิตร ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์แอมเบอร์ไลต์ ซีจี 50 แบบโซเดียมอิออน ขนาด 5 x 50 ซม. ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย อะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 4 และน้ำกลั่น ชะสารพิษด้วยสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ และนำไปดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ ได้ปริมาณสารพิษรวม 100 MU ศึกษาสมบัติด้วยวิธีอิเลกโทรโฟริซิส , โครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง และ เอช พี แอล ซี พบซัคซิทอกซินในเซลล์แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียม

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งวิธีทางชีวภาพและวิธีทางเคมีมีดังนี้

1. การทดสอบกับเนื้อเยื่อ (tissue culture assay) เป็นวิธีทางชีวภาพ

หลักการ อาศัยกลไกทางชีวภาพของสาร คือ การกีดขวางอย่างจำเพาะต่อช่องโซเดียมที่เซลล์ประสาท

การทดสอบทำได้ 2 แบบ คือ

-แบบนับเซลล์

โดยนำสารสกัดมาทดสอบกับเซลล์ประสาทหนูที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (mouse neuroblastoma cell line Neuro 2A ATCC CCL 131) อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารเคมี 2 ชนิด คือ เวอราตริดีน (veratridine) ซึ่งมีผลทำให้โซเดียมอิออนผ่านเข้าไปในเซลล์ได้เพิ่มขึ้น และวอบาย (ouabain) ซึ่งทำหน้าที่เป็น ตัวยับยั้งจำเพาะของเอนไซม์โซเดียม-โปตัสเซียม เอทีพีเอส (Na^+-K^+ ATPase) สารทั้งสองชนิดนี้จะทำให้โซเดียมอิออนเข้าไปในเซลล์ประสาทหนูไม่หยุดจนเซลล์บวมและตาย ในกรณีที่มีสารกีดขวางช่องโซเดียม สารนี้จะไปกีดขวางที่ช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทหนู ทำให้โซเดียมอิออนผ่านเข้าไปไม่ได้ เซลล์จึงไม่เกิดการบวมและยังคงมีชีวิต นับเซลล์เป็นและเซลล์ตายเพื่อคำนวณหาร้อยละของเซลล์ประสาทหนูที่มีชีวิต ถ้าการอยู่รอดของเซลล์เกิน 20 เปอร์เซนต์จึงจะถือว่าสารที่ตรวจสอบเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียม (กาญจนา จันทองจีน, 2536) และนำไปเทียบหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมจากกราฟมาตรฐาน ใช้หน่วย mouse unit (MU) บอกค่าความเป็นพิษ โดย 1 mouse unit หมายถึงปริมาณของสารที่ทำให้หนูตัวผู้น้ำหนัก 20 กรัม ตายภายในเวลา 30 นาที (Kawabata, 1978)

-แบบวิธีเอ็มทีที (MTT method)

หลักการทั่วไปจะเหมือนแบบวิธีนับเซลล์แต่ใช้การวัดค่าความดูดกลืนแสง จากการที่เซลล์ประสาทหนูที่มีชีวิตหลังการทดสอบด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียมจะมีเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสสามารถเปลี่ยนสารเอ็มทีที (MTT, 3-[4,5-dimethylthaiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) ไปเป็น

ผลึกสารเอ็มทีที-ฟอร์มาซาน (MTT-formazan crystal) ซึ่งเป็นสารที่มีสีน้ำเงินม่วง เมื่อละลายผลึกด้วยสารละลายไอโซโพรพานอล (isopropanol) จะได้สารละลายที่มีสี วัดค่าความดูดกลืนแสง คำนวณหาร้อยละของเซลล์ประสาทหนูที่มีชีวิตและเทียบหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมจากกราฟมาตรฐาน

2. วิธีอิเลกโทรโฟริซิส (electrophoresis)

หลักการ สารแต่ละชนิดจะมีประจุและขนาดแตกต่างกัน จึงมีความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ไม่เท่ากัน

สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซินและกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยมีขนาดโมเลกุลไม่เกิน 400 ดาลตัน และมีหมู่กัวนิดิเนียมภายในโมเลกุลซึ่งมีประจุบวก และสารบางอนุพันธ์ก็มีหมู่อื่น เช่น หมู่ซัลโฟคาร์บาโมอิล (sulfocarbamoyl group) ซึ่งมีประจุเป็นลบ จึงทำให้ประจุสุทธิบนสารแต่ละอนุพันธ์ไม่เท่ากัน ดังนั้นเมื่อใช้วิธีอิเลกโทรโฟริซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate membrane) และให้กระแสไฟฟ้าผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ในเวลาที่เหมาะสม สารจะสามารถเคลื่อนที่แยกจากกันได้ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดส์ (oxidizing reagent) เช่นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้ความร้อนเพื่อให้เกิดเป็นสารฟลูออโรฟลอร์ (fluorophore) ตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบระยะทางและทิศทางการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (Fallon and Shimizu, 1977)

นอกจากนี้ในการแยกชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมสามารถใช้วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีวิธีอื่น เช่น HPLC (Yasumoto et al.,1985 ; Oshima et al., 1989) และ LC-MS เป็นต้น

จากการที่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยทราย (sand clam; *Asaphis violascens*) บริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี (Juntongjin et al., 1993) เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูง และสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ทั้งสองกลุ่ม คือ สารกลุ่มเทโทรโดทอกซินและกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงสมบัติต่างๆของสารที่สร้างจากแบคทีเรียชนิดนี้เพิ่มขึ้น เพราะความรู้เรื่องสมบัติของสารอาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างสารที่ผลิตจากแบคทีเรียกับหอยทราย เพื่อยืนยันการสันนิษฐานที่ว่าแบคทีเรียอาจมีบทบาทต่อการเกิดพิษในสัตว์ทะเล และเนื่องจากความสัมพันธ์และกลไกการสร้างของสารกีดขวางช่องโซเดียมจากทั้งสอง

แหล่งยังไม่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้โครงสร้างของสารอาจมีความแตกต่างกัน เพราะจากการทดลองของ Matsumura (1995) พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี้ (monoclonal antibody)ที่ผลิตโดยใช้เทโทรโดทอกซินจากปลาปักเป้าเป็นแอนติเจน ไม่สามารถทำลายฤทธิ์ (neutralized) เทโทรโดทอกซินที่ผลิตจากแบคทีเรียได้ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ทางเคมี เช่น HPLC และ GC-MS ไม่สามารถพบความแตกต่างระหว่างสารจากทั้งสองแหล่ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะหาวิธีที่เหมาะสมในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียทะเล *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะศึกษาสมบัติของสารนี้ได้ อันจะเป็นพื้นฐานในการศึกษาโครงสร้างและความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างของสารในแบคทีเรียชนิดนี้และในหอยทรายต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย