พระบรมราชูปถัมภ์ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผล

1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

1.1 จากการแยกแบคทีเรียจากเนื้อหอยแมลงภู่ตัวอย่าง พบว่าเนื้อหอยแมลงภู่ที่นำมาศึกษามีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตเฉลี่ย 4.05×10^4 เซลล์ต่อเนื้อหอย 1 กรัม และได้นำโคโลนีจากจานเพาะเชื้อค่าเจือจางที่ 10^{-2} จำนวน 43 โคโลนี มาศึกษาลักษณะโคโลนีและจัดกลุ่ม ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีและจำนวนของแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อหอยแมลงภู่ โดยวิธี dilution spread plate บน ORI medium และบ่มที่ 28°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ลักษณะโคโลนี	จำนวน(โคโลนี)
กลม ขอบเรียบ นูนเล็กน้อย ทึบแสง สีเหลืองอ่อน 1.5-1.8 มม.	7
กลม ขอบเรียบ นูนเล็กน้อย โปร่งแสง สีขาว 1.5-1.8 มม.	6
แผ่ ขอบไม่เรียบ แบน ทึบแสง สีขาว	5
กลม ขอบเรียบ นูน ทึบแสง สีน้ำตาลอ่อน 1.4-1.6 มม.	5
กลม ขอบเรียบ แบน โปร่งแสง สีขาว 0.5-0.7 มม.	5
กลม ขอบไม่เรียบ นูน เยิ้ม ทึบแสง สีขาว 1.6-2.0 มม.	3
แผ่ ขอบหยัก แบน โปร่งแสง สีขาว	2
แผ่ ขอบเรียบ แบน โปร่งแสง สีขาว	2
กลม ขอบเรียบ นูน ทึบแสง สีขาว 0.5-0.7 มม.	2
กลม ขอบไม่เรียบ แบน ทึบแสง สีขาว 1.2-1.5 มม.	2
กลม ขอบไม่เรียบ นูน เยิ้ม โปร่งแสง สีขาว 1.8-2.0 มม.	2
กลม ขอบเรียบ นูน เยิ้ม ทึบแสง สีน้ำตาลอ่อน 1.8-2.0 มม.	2

ตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่นำมาแยกแบคทีเรียนี้ นำมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงในทะเลซึ่งอยู่ในเขตตำบลบางทราย จังหวัดชลบุรี โดยเก็บตัวอย่างในเดือนพฤษภาคม 2532 โดยปกติจะพบแบคทีเรียได้ในสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ เนื่องจากสัตว์เหล่านั้นได้รับแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณที่มันอาศัยอยู่ โดยมีปริมาณและชนิดแตกต่างกันไป

สงคราม เหลืองทองคำและคณะ (47) ได้ศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในตัวอย่างหอยแมลงภู่จากแหล่งเพาะเลี้ยงบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ระหว่างเดือนมกราคม ถึง ตุลาคม 2525 พบว่ามีปริมาณสูงสุดในเดือนพฤษภาคม คือมีจำนวน 7.5×10^7 เซลล์ต่อเนื้อหอย 1 กรัม โดยแยกแบคทีเรียด้วยวิธี dilution spread plate บน Marine agar และบ่มที่ 25° ซ เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จะพบว่าแตกต่างจากค่าที่ได้ในการวิจัยนี้ ทั้งนี้เนื่องจากหอยแมลงภู่ที่นำมาแยกแบคทีเรียมาจากแหล่งที่ต่างกัน รวมทั้งเวลาที่เก็บตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แตกต่างกันด้วย

1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

นำแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละโคโลนี มาตรวจสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในเซลล์โดยนำสารสกัดจากเซลล์มาตรวจสอบด้วยวิธี tissue culture assay (42) ดังขั้นตอนที่กล่าวแล้วในบทที่ 3 ข้อ 1.4 ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 จะพบว่าแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด 43 โคโลนี ให้ผลบวกกับการตรวจสอบ 10 โคโลนี หรือคิดเป็นร้อยละ 23.25 โดยมีปริมาณสารเมื่อคิดเป็นสาร TTX ในสารสกัดจากเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัม ตั้งแต่ 0.487 ถึง 0.837 นาโนกรัม

Do และคณะ (8) ได้รายงานว่า แบคทีเรีย 49 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตะกอนในทะเลลึก สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ 22 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 44.89 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ที่อุณหภูมิ 25° ซ โดยมีการเขย่า เป็นเวลา 3 วัน และตรวจหาสารในสารสกัดจากเซลล์ด้วยวิธี tissue culture assay เช่นเดียวกัน

Yasumoto และคณะ (4) ได้รายงานการพบสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs อนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX ในสารสกัดจากเซลล์ของ Pseudomonas สายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากสาหร่ายทะเล Jania sp. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาตร 12 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25° ซ โดยไม่ให้อากาศเป็นเวลา 12 วัน พบว่ามีปริมาณรวมของสารน้อยกว่า 10 ไมโครกรัม

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียม ในสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้เมื่อตรวจสอบโดยวิธี tissue culture assay (42)

แบคทีเรียหมายเลข	tissue culture assay (ร้อยละ)*	TTX (นาโนกรัม)**	TTX (นาโนกรัม) ต่อมก.น้ำหนักแห้ง
1	21.43	0.282	0.504
7	25.88	0.384	0.596
9	28.51	0.442	0.567
10	22.76	0.310	0.487
11***	28.74	0.448	0.837
24	24.17	0.342	0.525
26	23.12	0.320	0.531
30	25.26	0.374	0.665
33	25.93	0.387	0.641
40	26.70	0.400	0.549

* หมายถึงร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิต

** หมายถึงค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิตกับปริมาณสารมาตรฐาน tetrodotoxin (TTX) เมื่อใช้สาร TTX เป็นตัวแทนของสารกีดขวางช่องโซเดียม

*** แบคทีเรียหมายเลข 11 ซึ่งคัดเลือกไว้ใช้ศึกษาต่อไป

2. การจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการ สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียหมายเลข 11 ที่คัดเลือกได้ว่าอยู่ในสกุล Vibrio โดยยึดหลักการจัดจำแนกแบคทีเรียตามหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (45) ซึ่งรายละเอียดของวิธีการทดสอบและผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียหมายเลข 11 ที่คัดเลือกได้

วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
1. ลักษณะโคโลนี	
รูปร่าง	กลม ขอบเรียบ นูนเล็กน้อย
ขนาด	1.5-1.8 มม.
สี	ขาว
ลักษณะทางออปติคัล	โปร่งแสง
2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
รูปร่าง	ท่อนขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 μm
การติดสี	กรัมลบ
สปอร์	–
การเคลื่อนที่	+
3. ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	
การเจริญบน TCBS	$+ , S^{+}$
TSI	K/A
เอนไซม์ไลซีนดีอะมิเนส	+
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	–
อินโดล	+

ตารางที่ 4 (ต่อ)

วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
MR	+
VP	–
เอนไซม์ออกซิเดส	+
ซิเตรต	–
OF glucose	F
การเจริญในโซเดียมคลอไรด์	
0 เปอร์เซ็นต์	–
2	+++
4	++
6	++
8	+
10	+
12	–
การเรืองแสง (luminessense)	–

+ หมายถึง ให้ผลบวกในการทดสอบ

– หมายถึง ให้ผลลบในการทดสอบ

S^+ หมายถึง ใช้น้ำตาลซูโครสได้

K/A หมายถึง ส่วนผิวเอียงเป็นด่าง (alkaline slant)
ส่วนตั้งตรงเป็นกรด (acid button)

F หมายถึง Fermentation

Vibrios เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำทะเลและสัตว์ทะเลโดยทั่วไป (48) ได้มีผู้รายงานว่า Vibrio สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ เช่น Noguchi และคณะ (5) ได้พบว่า Vibrio สายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากลำไส้ของปูทะเล Altergatis floridis สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs อนุพันธุ์ TTX และ anhydro-TTX ได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานของ Shimidu และคณะ (6) รวมทั้งรายงานของ Do และคณะ (8) ด้วย

3. การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมบริสุทธิ์บางส่วน

ผลการนำสารละลายของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย Vibrio sp. หมายเลข11 ที่คัดเลือกได้มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์ โดยใช้คอลัมน์เซพแพค ซี 18 (Sep-Pak C18 cartridge) และคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (Bio-Gel P-2 column) ซึ่งมีรายละเอียดของขั้นตอนการทดลองดังบทที่ 3 ข้อ 3

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนและผลการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจาก Vibrio sp. หมายเลข 11 ที่คัดเลือกได้บริสุทธิ์บางส่วน

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	น้ำหนักแห้ง (มก.)	tissue culture assay (ร้อยละ*)	TTX (นาโน-กรัม)**	TTX(นาโน-กรัม)ต่อมก. น้ำหนักแห้ง	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	TTX ทั้งหมด (นาโน-กรัม)	TTX ที่เหลือ (เปอร์-เซ็นต์)
สารสกัดจาก เซลล์แบคทีเรีย	695.0	35.01	0.608	0.699	1.00	485.80	100.00
เซพแพค ซี18	540.0	38.19	0.684	0.760	1.08	410.40	84.48
ไบโอเจล พี2	289.0	40.95	0.748	1.036	1.48	299.40	61.63

* หมายถึง ร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิต

** หมายถึง ค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิต กับปริมาณของสารมาตรฐาน tetrodotoxin (TTX) โดยใช้สาร TTX เป็นตัวแทนของสารกีดขวางช่องโซเดียม

เซพแพค ซี 18 เป็นโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์แบบรีเวอร์สเฟส (reverse phase chromatography) อาศัยหลักการแยกสารโดยสารที่มีขั้ว (polarity) ต่ำ จะไม่ถูกจับไว้ในคอลัมน์ ส่วนสารที่มีขั้วสูงซึ่งรวมทั้งสารกัดขวางช่องโซเดียมจะถูกจับไว้ จากนั้นจึงชะออกมาด้วยสารละลายที่มีขั้วสูงขึ้น ซึ่งในกรณีนี้ได้แก่กรดอะซีติคเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ส่วนคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 เป็นโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์แบบที่แยกสารโดยอาศัยขนาดของโมเลกุล (gel filtration chromatography) โดยไบโอเจล พี 2 จะคัดแยกสารโมเลกุลขนาด 100 - 1,800 ดาลตัน ดังนั้น สารที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วงดังกล่าวรวมทั้งสารกัดขวางช่องโซเดียมจะถูกดูดซับไว้ในโมเลกุล และถูกปล่อยออกมาเมื่อใช้ตัวชะซึ่งได้แก่ กรดอะซีติคเข้มข้น 0.3 โมลาร์เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ทั้งสองชนิดดังกล่าว สารกัดขวางช่องโซเดียมตัวอย่างจะบริสุทธิ์ขึ้นได้ กล่าวคือเมื่อผ่านคอลัมน์เซพแพค ซี 18 สารจะบริสุทธิ์ขึ้น 1.08 เท่า และมีปริมาณสารที่เหลืออยู่ 84.48 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเมื่อนำมาผ่านคอลัมน์ ไบโอเจล พี 2 สารจะบริสุทธิ์ขึ้น 1.48 เท่า และมีปริมาณสารที่เหลืออยู่ 61.63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารมีความบริสุทธิ์ขึ้นไม่มากนัก แต่เนื่องจากต้องการทำให้สารกัดขวางช่องโซเดียมบริสุทธิ์เพียงบางส่วน เพื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธีทางเคมีเท่านั้น และได้พบว่าขั้นตอนที่ใช้ดังกล่าวทำให้สารมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะวิเคราะห์ได้ (ดังได้แสดงผลการวิเคราะห์ไว้ในข้อที่ 4)

Yasumoto และคณะ (4) ได้รายงานการวิเคราะห์ชนิดของสารกัดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากเซลล์ของ Pseudomonas sp. โดยทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและนำเฉพาะส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography) โดยไม่ได้ผ่านขั้นตอนการทำให้สารบริสุทธิ์ก่อน

สำหรับวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารกัดขวางช่องโซเดียม ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์นั้น ใช้วิธี tissue culture assay และเปรียบเทียบปริมาณสารเมื่อคิดเป็นนาโนกรัมของสาร tetrodotoxin ในสารสกัดจากเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัม ซึ่งพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นในแต่ละขั้นตอน ดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

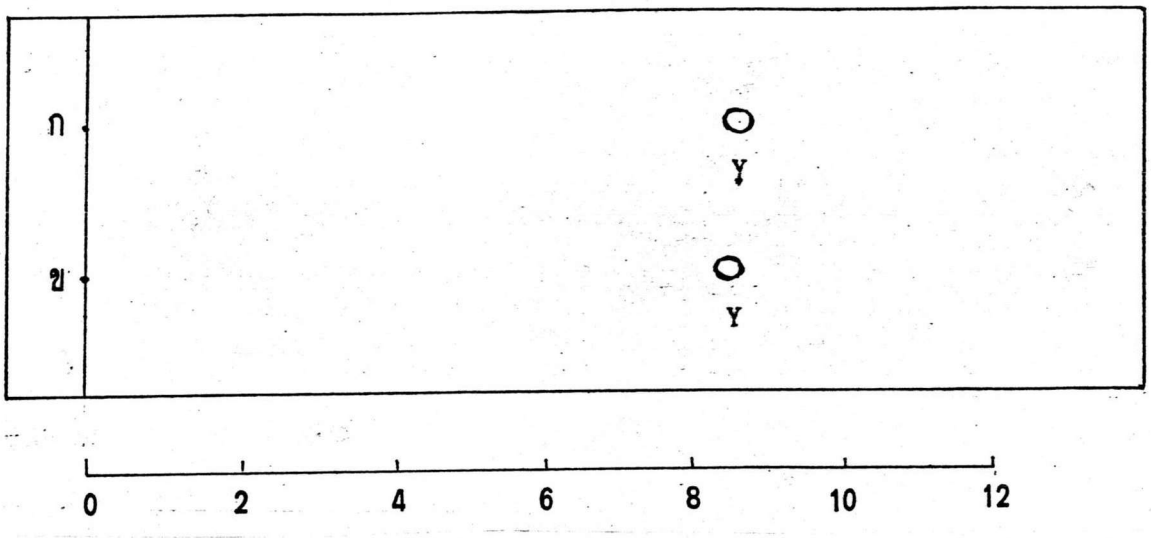
ส่วนที่ได้จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ จะนำมาวิเคราะห์ชนิดของสารกัดขวางช่องโซเดียมต่อไป

4. การวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมจาก Vibrio sp. หมายเลข 11

โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางเคมี 3 วิธี ได้แก่ วิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง วิธีอิเลคโตรโฟรีซีส และ วิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ซึ่งได้แสดงขั้นตอนและวิธีการทดลองไว้ในบทที่ 3 ข้อ 5 โดยใช้ระบบการวิเคราะห์ทั้งของสารกลุ่ม tetrodotoxin (TTXs) และสารกลุ่ม saxitoxin (STXs) ซึ่งสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ได้แก่ สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์ทั้งสองแบบดังกล่าวแล้ว

4.1 การวิเคราะห์ชนิดของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (thin layer chromatography, TLC)

รูปที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกัดขวางช่องโซเดียม ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs



ก หมายถึง สารมาตรฐานผสม TTX และ anhydro-TTX

ข หมายถึง สารตัวอย่าง

Y หมายถึง เรืองแสงสีเหลืองอมเขียว (greenish yellow fluorescence)

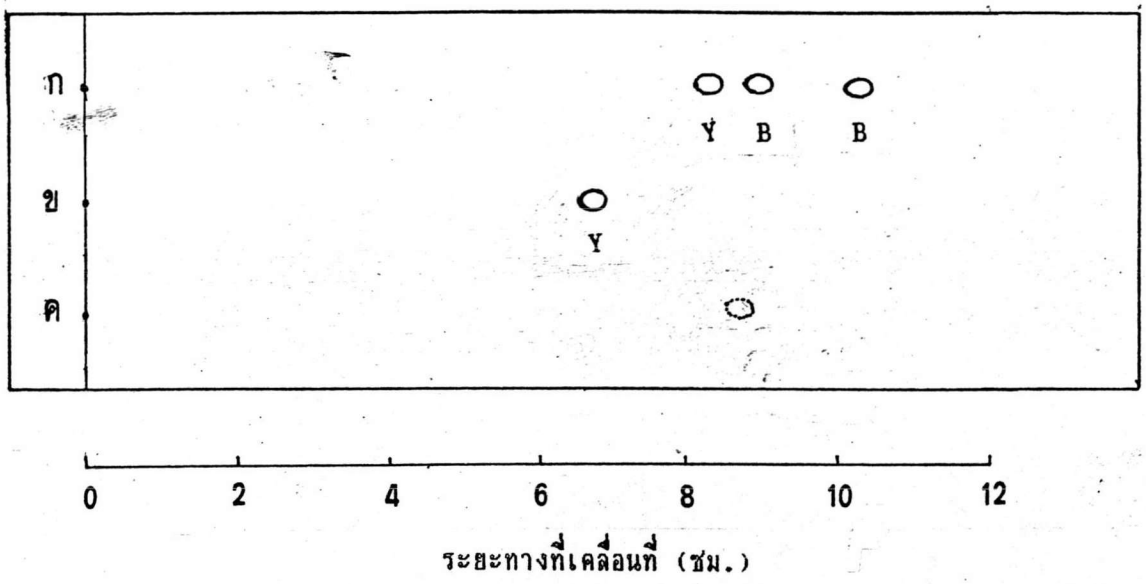
ระบบตัวทำละลาย ; ไพริดีน : เอทธิลอะซีเตต : กรดอะซีติค : น้ำ =15:5:3:4

ตัวออกซิไดซ์ ; 3 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์

ปฏิกิริยา ; 110°ซ 10 นาที

จากรูปที่ 1 จะพบว่า สารตัวอย่างมีค่า retention factor (Rf) ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน (0.72 และ 0.73 ตามลำดับ) และให้สารเรืองแสงสีเหลืองอมเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตรเช่นเดียวกัน

รูปที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบางเมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs



ก หมายถึงสารมาตรฐานผสม GTX 1-4

ข หมายถึงสารมาตรฐานผสม STX และ neoSTX

ค หมายถึงสารตัวอย่าง

B หมายถึงเรืองแสงสีฟ้า (blue fluorescence)

Y หมายถึงเรืองแสงสีเหลืองอมเขียว

ระบบตัวทำละลาย ; ไพริดีน: เอทธิลอะซีเตต: กรดอะซีติค: น้ำ = 15:5:3:4

ตัวออกซิไดซ์ ; 1 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ปฏิกิริยา ; 110° ซ 10 นาที

จากรูปที่ 7 พบว่าสารตัวอย่างมีค่า Rf ไม่เท่ากับสารมาตรฐานกลุ่ม STXs ทุกอนุพันธ์ที่ใช้ (ก และ ข) รวมทั้งพบว่าทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์คือ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้ไม่ดีทำให้มองเห็นการเรืองแสงไม่ชัดเจน ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

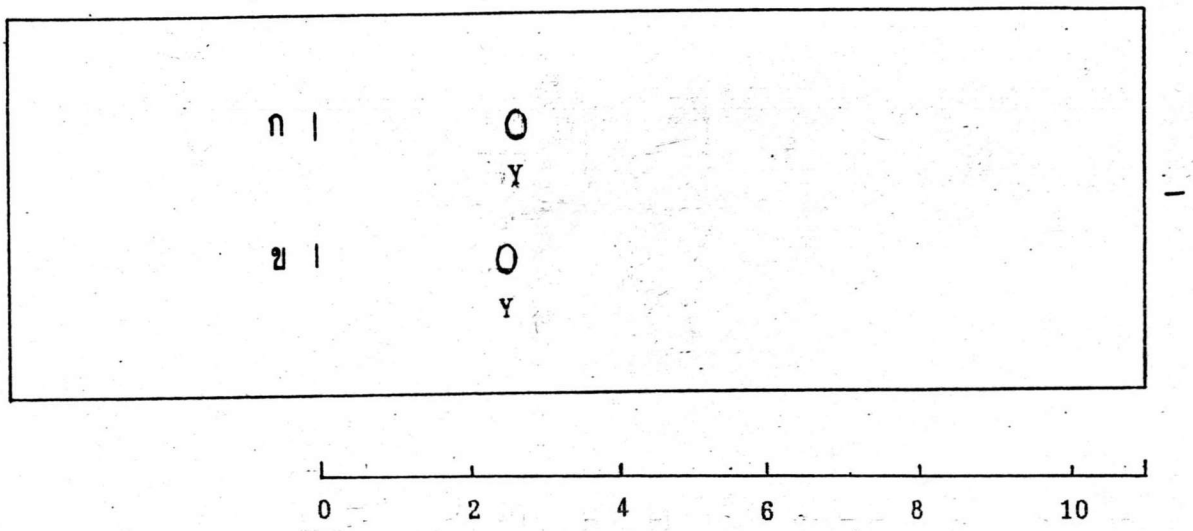
จากผลการวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธี TLC โดยใช้ระบบการวิเคราะห์สารทั้งสองระบบดังกล่าว พบว่าระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยไพริดีน เอทธิลอะซีเตต กรดอะซีติค และน้ำในอัตราส่วน 15:5:3:4 โดยปริมาตร เพียงระบบเดียว ไม่สามารถแยกสารแต่ละอนุพันธ์ได้อย่างชัดเจน ดังจะเห็นได้จาก สารมาตรฐานที่ใช้ซึ่งได้แก่ สารผสมของอนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX รวมทั้งสารมาตรฐานกลุ่ม STXs ซึ่งได้แก่สารผสมอนุพันธ์ GTX 1-4 และสารผสมอนุพันธ์ STX และ neoSTX ซึ่งบางอนุพันธ์ไม่แยกจากกัน ดังนั้นจึงควรแปร polarity ของระบบตัวทำละลายให้เหมาะสมจึงจะทำให้ผลที่ได้ชัดเจนขึ้น

Yasumoto และคณะ (4) ใช้อัตราส่วนของระบบตัวทำละลายดังกล่าวเป็น 15:7:3:6 และได้พบว่าสารอนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX แยกจากกันได้ โดยมีค่า R_f 0.64 และ 0.71 ตามลำดับ

เนื่องจากวิธี TLC นี้ เป็นวิธีทางเคมีวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมร่วมกับวิธีอื่นๆ เช่นวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความถูกต้องสูงกว่า ดังนั้นจึงไม่ได้แปร polarity ของระบบตัวทำละลายดังกล่าวข้างต้น

4.2 การวิเคราะห์ชนิดของสารโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis,EP)

รูปที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs



ก หมายถึงสารมาตรฐานผสม TTX และ anhydro-TTX (2)

ข หมายถึงสารตัวอย่าง

Y หมายถึงเรืองแสงสีเหลืองอมเขียว

บัฟเฟอร์ ; 0.08 โมลาร์ ทริส ความเป็นกรดด่าง 8.7

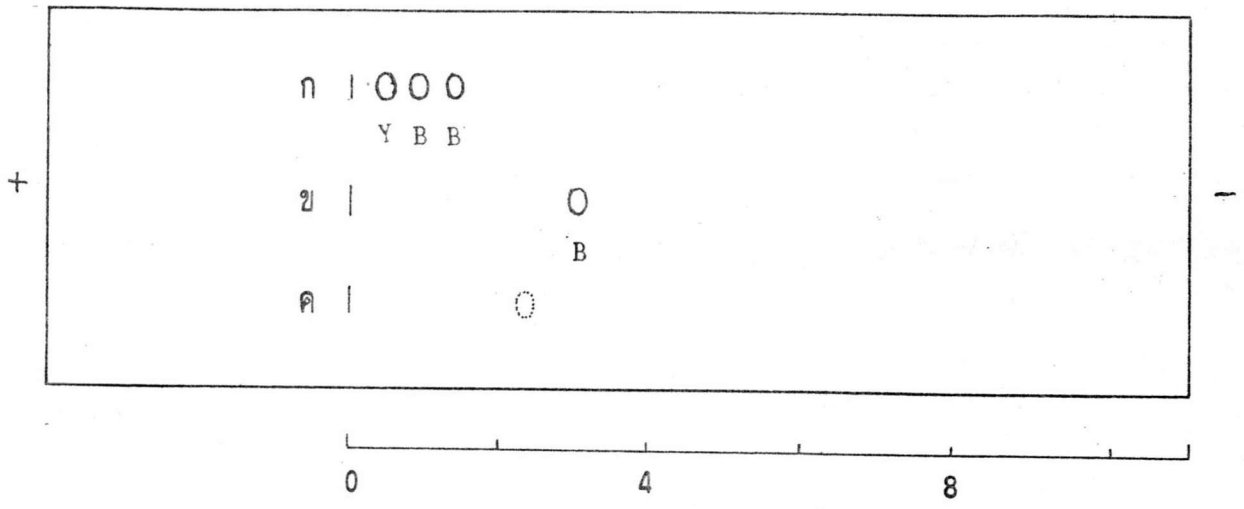
กระแสไฟ ; 0.8 มิลลิแอมแปร์ ต่อความกว้างของแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต 1 ซม.

ตัวออกซิไดซ์ ; 3 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์

ปฏิกิริยา ; 110° ซ 10 นาที

จากรูปที่ 8 พบว่าสารมาตรฐานและสารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบเช่นเดียวกัน โดยเคลื่อนที่ไปได้ 2.6 และ 2.4 ซม. ตามลำดับ รวมทั้งให้ผลในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เช่นเดียวกันคือ สีเหลืองอมเขียว

รูปที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs



ระยะทางที่เคลื่อนที่ (ซม.)

ก หมายถึงสารมาตรฐานผสม GTX 1-4

ข หมายถึงสารมาตรฐานผสม STX และneo STX

ค หมายถึงสารตัวอย่าง

B หมายถึงเรืองแสงสีฟ้า

Y หมายถึงเรืองแสงสีเหลืองอมเขียว

บัฟเฟอร์ ; 0.08 โมลาร์ ทริส ความเป็นกรดด่าง 8.7

กระแสไฟ ; 0.8 มิลลิแอมแปร์ ต่อความกว้างของแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต 1 ซม.

ตัวออกซิไดซ์ ; 1 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ปฏิกิริยา ; 110° ซ 10 นาที

จากรูปที่ 9 พบว่าสารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบในระยะทางที่ไม่เท่าหรือใกล้เคียงกับ สารมาตรฐานกลุ่ม STXs ที่ใช้ (ก และ ข) และมองเห็นการเรืองแสงฟลูออเรสเซนไม่ชัดเจนภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

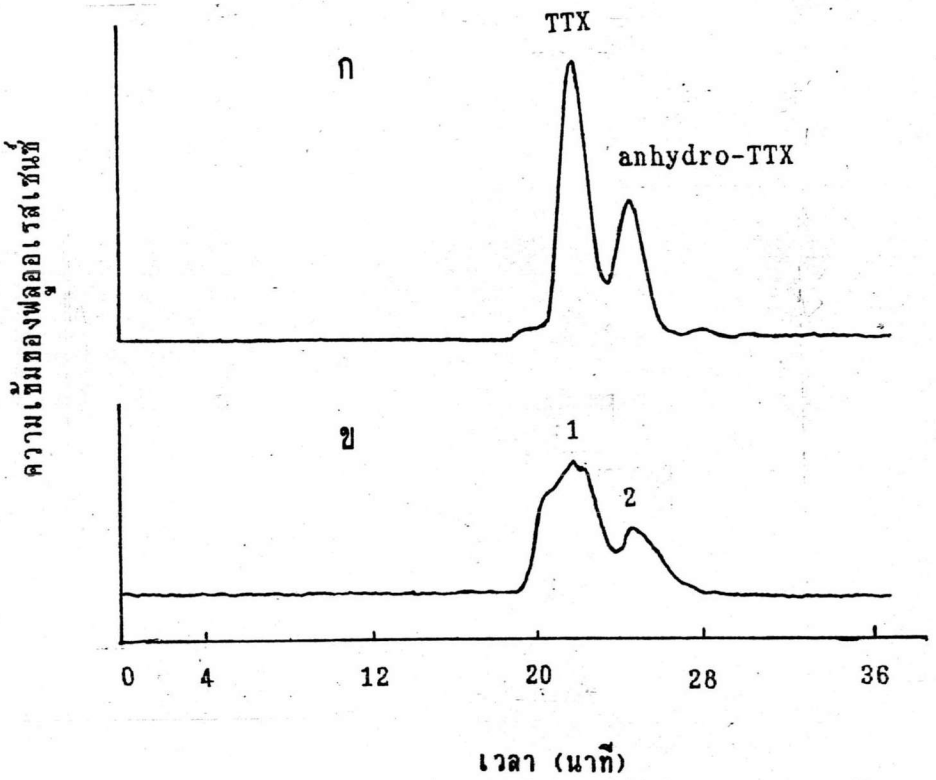
จากผลการทดลองในข้อ 4.2 จะพบว่า ระบบของวิธี EP ที่ใช้วิเคราะห์ชนิดของสารนี้ไม่สามารถแยกสารแต่ละอนุพันธ์ได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารแต่ละอนุพันธ์มีประจุสุทธิใกล้เคียงกันรวมทั้งเวลาที่ใช้น้อยเกินไป

Fallon และคณะ (38) ได้ใช้ระบบการทำ EPเช่นเดียวกันนี้ และพบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการทำให้นานขึ้น สารกัดขวางช่องโซเดียมแต่ละอนุพันธ์จะแยกจากกันได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

4.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

ใช้ระบบการวิเคราะห์สาร 2 ระบบเช่นเดียวกันคือ ระบบที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs และระบบที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม STXs ซึ่งมีส่วนประกอบดังที่ได้กล่าวแล้วในบทที่ 3 ข้อ 4.3

รูปที่ 10 แสดงโครมาโตแกรมของไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs



ก โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานผสม TTX และ anhydro-TTX

ข โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง

โมบายล์เฟส ; 3 เปอร์เซ็นต์ อะซีโตไนไตรล์ใน 0.005 นอร์มัล เฮปตาฟลูออโรบิวทิริค แอซิด และ 0.05 นอร์มัล กรดอะซีติค ความเป็นกรดด่าง 5.0 อัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

ตัวออกซิไดซ์ ; 4 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ อัตราการไหล 0.3 มล.ต่อนาที

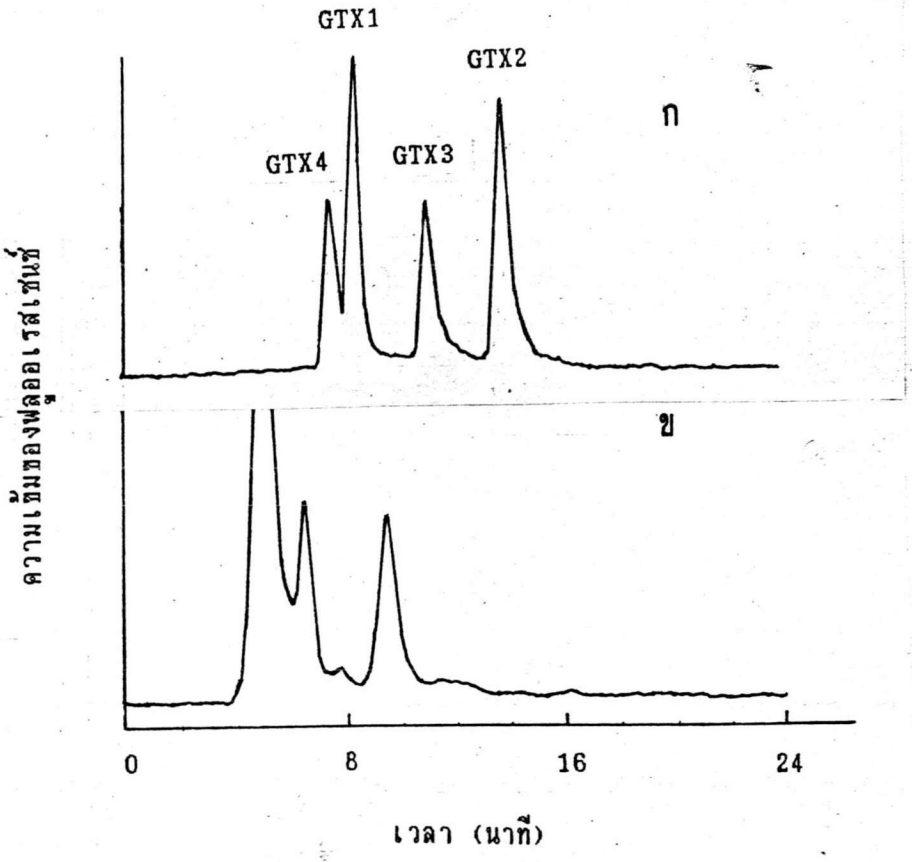
ปฏิกิริยา ; 100° ซ

excitation ; 381 นาโนเมตร

emission ; 505 นาโนเมตร

จากรูปที่ 10 พบว่าสารตัวอย่างมีพีคที่ให้ค่า retention time เท่ากับสารมาตรฐาน 2 พีค คือ พีค 1 และ พีค 2

รูปที่ 11 แสดงโครมาโตแกรมของไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs อนุพันธ์ GTX 1-4



ก. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานผสม GTX 1-4

ข. โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง

โมบายล์เฟส ; 2 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนต ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมฟอสเฟต ความเป็นกรดด่าง 7.2 อัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที

ตัวออกซิไดซ์ ; 7 มิลลิโมลาร์เปอร์ไอออดิก แอซิด ใน 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 9.0 อัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที

กรด ; 0.5 โมลาร์ กรดอะซีติค อัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

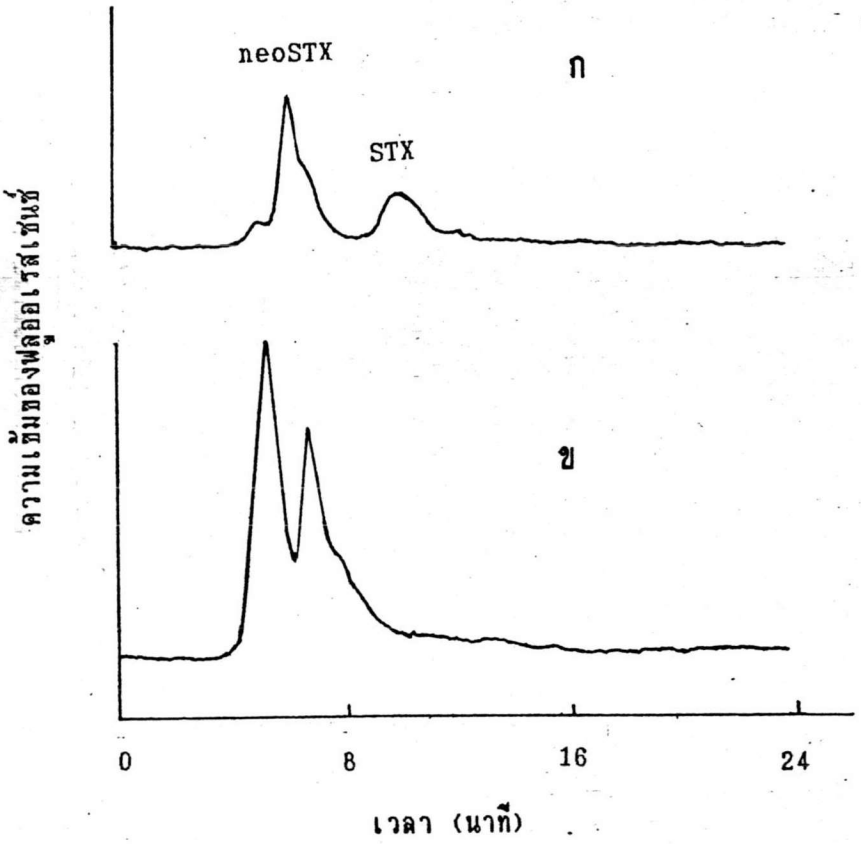
ปฏิกิริยา ; 65° ซ

excitation; 330 นาโนเมตร

emission ; 390 นาโนเมตร

จากรูปที่ 11 พบว่าสารตัวอย่างไม่มีพีคที่มีค่า retention time เท่าหรือใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐาน

รูปที่ 12 แสดงโครมาโตแกรมของไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs อนุพันธ์ STX และneoSTX



ก โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานผสม STX และ neo STX

ข โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง

โมบายล์เฟส ; สารละลายสำหรับวิเคราะห์ GTX1-4 ผสมกับอะซีโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 โดยปริมาตร อัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที

ตัวออกซิไดซ์ ; 7 มิลลิโมลาร์ เปอร์ไอออดิกแอซิด ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 9.0 อัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

กรด ; 0.5 โมลาร์ กรดอะซีติค อัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

ปฏิกิยา ; 65° ซ

excitation ; 330 นาโนเมตร

emission ; 390 นาโนเมตร

จะเห็นว่าสารมาตรฐานไม่มีพีคที่มีค่า retention time เท่าหรือใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐานเช่นเดียวกัน

จากรูปที่ 10 ถึง 12 พบว่าระบบของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้ สามารถแยกสารแต่ละอนุพันธ์ได้ ดังเช่นในกรณีของระบบที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs พบว่าสารมาตรฐานที่ใช้ซึ่งเป็นสารผสมของอนุพันธ์ TTXและ anhydro-TTX มีค่า retention time แตกต่างกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 10 ก) ส่วนระบบ HPLC ที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม STXs นั้น พบว่าสามารถแยกสารมาตรฐานผสมแต่ละอนุพันธ์ได้เช่นเดียวกัน (รูปที่ 11 ก และ 12 ก) และเมื่อเปรียบเทียบค่า retention time ของสารตัวอย่าง กับสารมาตรฐานทั้งสองกลุ่มพบว่าสารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียที่นำมาวิเคราะห์เป็นสารกลุ่ม TTXs อนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX โดยมีอัตราส่วนของสารอนุพันธ์ TTX สูงกว่าสารอีกอนุพันธ์หนึ่ง ดังแสดงในโครมาโตแกรมรูป ที่ 10 ข

ดังนั้น จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีทั้ง 3 วิธีดังกล่าว คือวิธี TLC วิธี EP และวิธี HPLC สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรีย Vibrio sp. หมายเลข 11 ที่คัดเลือกได้สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs อนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°ซ โดยมีการเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชม. โดยมีอัตราส่วนของสารอนุพันธ์ TTX มากกว่าอนุพันธ์ anhydro-TTX

5. การศึกษารูปแบบของการเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

โดยศึกษาแบคทีเรีย Vibrio sp. ที่คัดเลือกได้ในสภาวะการบ่มเชื้อ 2 สภาวะคือ มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 264 ชม.

5.1 การเจริญของแบคทีเรีย Vibrio sp. หมายเลข 11

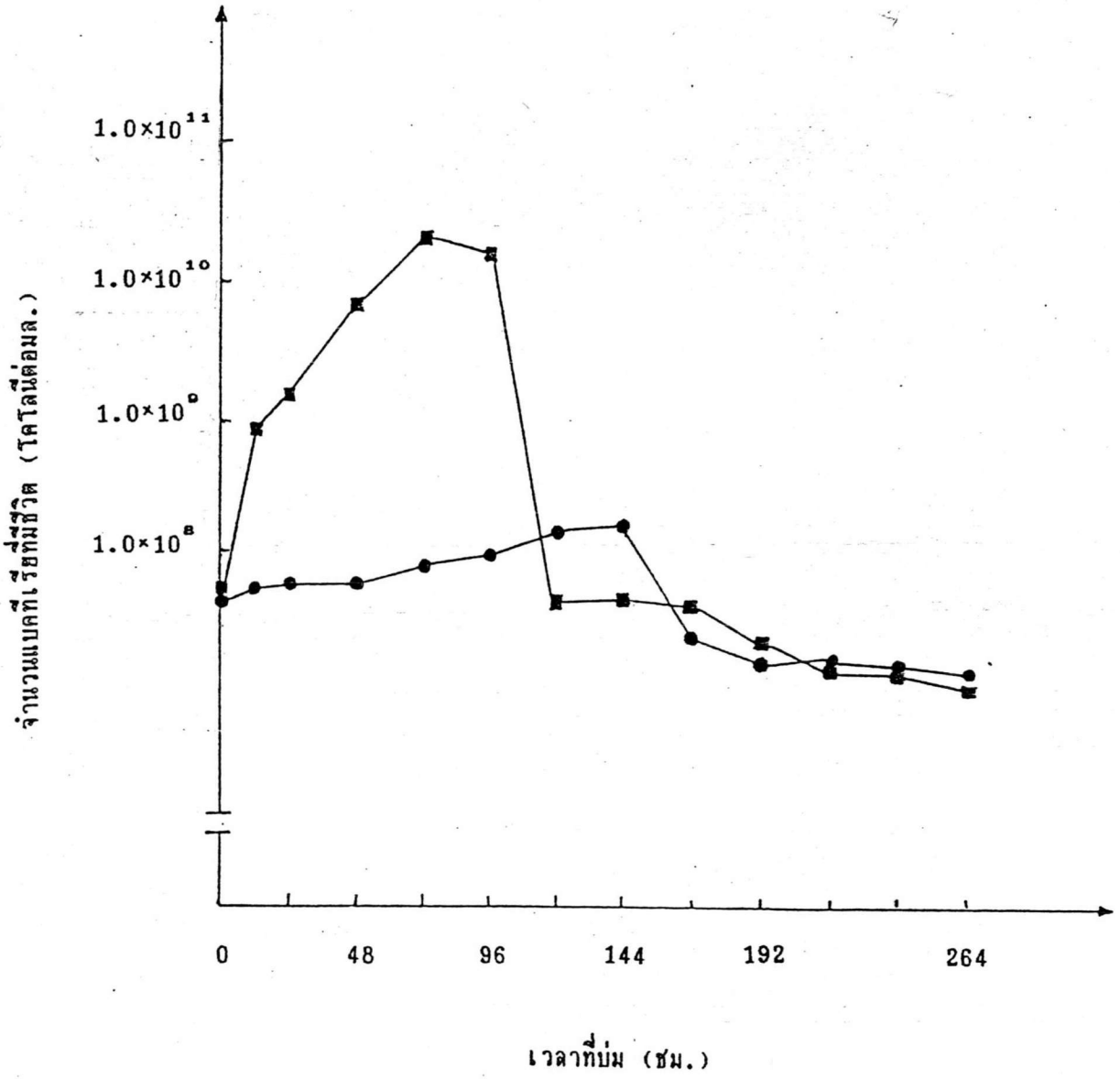
วัดการเจริญโดยหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดต่อ 1 หน่วยปริมาตร

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตต่อ 1 หน่วยปริมาตร และความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาต่างๆของการบ่มเชื้อ ในสภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 28°ซ

เวลาที่บ่ม (ชม.)	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต (โคโลนีต่อมล.)*		ความเป็นกรดด่าง	
	มีการเขย่า	ไม่มีการเขย่า	มีการเขย่า	ไม่มีการเขย่า
0	7.40×10^{7}	7.35×10^{7}	7.54	7.53
12	2.10×10^{9}	7.85×10^{7}	7.93	7.53
24	4.40×10^{9}	8.10×10^{7}	8.20	7.51
48	9.50×10^{9}	8.35×10^{7}	8.65	7.45
72	4.45×10^{10}	9.85×10^{7}	8.74	7.48
96	2.20×10^{10}	1.30×10^{8}	8.92	7.38
120	6.85×10^{7}	3.00×10^{8}	8.88	7.32
144	6.90×10^{7}	3.50×10^{8}	8.90	7.21
168	6.70×10^{7}	4.50×10^{7}	9.02	6.95
192	4.05×10^{7}	2.60×10^{7}	8.91	6.64
216	2.40×10^{7}	2.55×10^{7}	8.93	6.52
240	2.14×10^{7}	2.50×10^{7}	8.91	6.53
264	1.85×10^{7}	1.00×10^{7}	8.90	6.51

* ได้จากวิธี dilution spread plate

เมื่อนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด ต่อ 1 หน่วยปริมาตร กับเวลาที่บ่ม (ชม.) จะได้ดังนี้



รูปที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรีย Vibrio sp. หมายเลข 11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่อุณหภูมิ 28°ซ นาน 264 ชม.

■—■ สภาวะที่มีการเขย่า

●—● สภาวะที่ไม่มีการเขย่า

จากผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่าแบคทีเรีย Vibrio sp. หมายเลข 11 จะเจริญในสภาวะที่มีการเขย่าได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ต้องการอากาศในการเจริญและการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งการวัดการเจริญของแบคทีเรียในกรณีนี้ใช้วิธีนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดต่อ 1 หน่วยปริมาตร (โคโลนีต่อมล.) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญในช่วงเวลาต่างๆของการบ่มเชื้อพบว่า ในสภาวะที่มีการเขย่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วโดยไม่มีระยะพัก (lag phase) (รูปที่ 13) ทั้งนี้ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ กับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้ในการศึกษาเป็นชนิดเดียวกัน (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยการเจริญจะสูงสุดภายในเวลา 72 ชม.ของการบ่มเชื้อ และจะลดลงอย่างรวดเร็วในอีก 24 ชม.ต่อมา จากนั้น จึงลดลงอย่างช้าๆ จนถึงเวลา 264 ชม. ของการบ่ม ซึ่งสาเหตุที่การเจริญของแบคทีเรียลดลงนั้นอาจอธิบายได้ว่า ในระหว่างที่มีการเจริญ แบคทีเรียจะสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆขึ้นมามากมาย และปล่อยออกมานอกเซลล์ด้วย ซึ่งมีผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลงไปจากค่าประมาณ 7.5 เมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ เป็นประมาณ 9.0 เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 120 ชม.เป็นต้นไป ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างที่เพิ่มขึ้นนี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนั้นการที่แบคทีเรียมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจึงมีผลให้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้น และเกิดสภาวะการขาดแคลนอาหาร ทำให้แบคทีเรียบางส่วนตายลง และจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรลดลงในช่วงเวลาดังกล่าว

ส่วนในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเขย่า Vibrio sp. หมายเลข 11 จะมีการเจริญน้อยกว่าในสภาวะแรกมาก (รูปที่ 13) โดยในช่วงเวลาแรก (ชม.ที่12-120) การเจริญจะเป็นไปอย่างช้าๆ และสูงสุดเมื่อบ่มเชื้อนาน 144 ชม. จากนั้นการเจริญจะค่อยๆลดลงจนสิ้นสุดระยะเวลาของการบ่ม (264 ชม.) และเมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละช่วงเวลาพบว่า จะลดลงจากเมื่อเริ่มต้นเล็กน้อย คือจากค่าประมาณ 7.5 เป็น ประมาณ 6.5 ในชม. ที่ 264

5.2 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในช่วงเวลาต่างๆของการบ่มเชื้อ

ก. สภาวะที่มีการเขย่า

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยคิดเป็นสาร TTX ในสารสกัดจากเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว ในช่วงเวลาต่างๆของการบ่มเชื้อที่ 28°ซ โดยมีการเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 264 ชม.

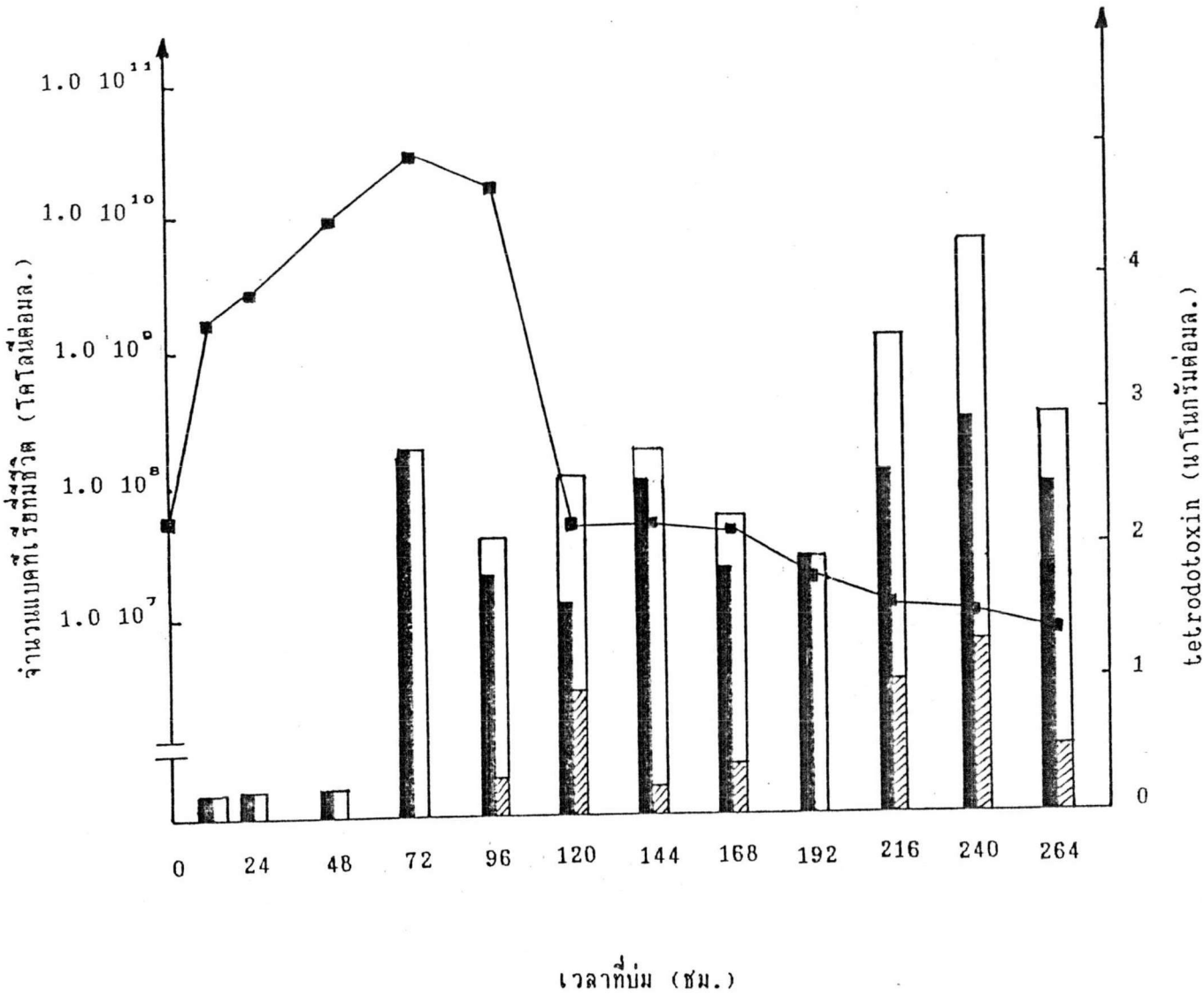
เวลาที่บ่ม (ชม.)	สารสกัดจากเซลล์		อาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว		TTX รวม (นาโนกรัมต่อ มล.)
	tissue culture assay (ร้อยละ)	TTX(นาโนกรัมต่อ มล.)	tissue culture assay (ร้อยละ)	TTX(นาโนกรัมต่อ มล.)	
12	18.11	0.178	–	–	0.178
24	22.00	0.191	–	–	0.191
48	30.92	0.198	–	–	0.198
72	41.72	2.745	–	–	2.745
96	53.82	1.806	15.29	0.280	2.086
120	31.30	1.603	17.34	0.934	2.537
144	50.92	2.520	20.40	0.229	2.749
168	59.43	1.857	17.07	0.384	2.241
192	55.73	1.934	18.89	-	1.934
216	55.79	2.594	16.94	1.067	3.661
240	48.79	2.935	24.95	1.315	4.250
264	46.79	2.490	18.91	0.502	2.992

* หมายถึงร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิต

\- หมายถึงไม่พบ

จากตารางที่ 7 พบว่าปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียมเมื่อคิดเป็นสาร TTX ในสารสกัดจากเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงไปในช่วงเวลาของการบ่มเชื้อ เมื่อตรวจหาแอคติวิตีของสารด้วยวิธี tissue culture assay โดยจะพบสารได้ตั้งแต่ ชม.ที่ 48 ของการบ่ม และมีปริมาณสูงขึ้นในชม. ที่ 72 จากนั้นจะลดลงและเพิ่มขึ้นอีกเมื่อถึง ชม.ที่ 144 โดยมีค่าสูงสุดอยู่ที่ชม.ที่ 240 ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วนั้น จะเริ่มพบแอคติวิตีของสารเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี tissue culture assay เช่นเดียวกัน ในชม.ที่ 96 ของการบ่ม จนถึงสิ้นสุดการบ่ม (ชม.ที่ 264) โดยมีปริมาณไม่คงที่เช่นเดียวกัน การที่ พบสารในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาดังกล่าว คาดว่าเนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์แบคทีเรียเกิดการแตก (lysis) ทำให้ส่วนประกอบที่อยู่ภายในเซลล์รวมทั้งสารกีดขวางช่องโซเดียมออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาดังกล่าวค่อนข้างสูง จึงอาจมีผลให้สารกีดขวางช่องโซเดียมสลายตัวได้ (29) ทำให้ปริมาณที่พบไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับในสารสกัดจากเซลล์

เมื่อนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย กับปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมเมื่อคิดเป็นสาร TTX จะได้ดังรูปที่ 14 ซึ่งจะพบว่า Vibrio sp. หมายเลข 11 ที่คัดเลือกมาศึกษา สร้างสารในช่วงระยะการเจริญเพิ่มขึ้นจนถึงระยะการเจริญลดลงโดยมีปริมาณรวมสูงสุดในชม.ที่ 240 ของการบ่ม ซึ่งเป็นช่วงที่การเจริญของแบคทีเรียอยู่ในระยะลด (declined phase) เมื่อพิจารณาปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละช่วงเวลาพบว่า มีค่าเปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาของการบ่ม จากผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมในข้อ 4 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ สร้างสารกลุ่ม TTXs อนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX ได้ ดังนั้น การที่ปริมาณของสารเปลี่ยนแปลงไปเช่นนี้อาจอธิบายได้ด้วยเหตุผลหนึ่งว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารทั้งสองอนุพันธ์ดังกล่าว เนื่องจากสารทั้งสองอนุพันธ์นี้มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมไม่เท่ากัน กล่าวคือ สารอนุพันธ์ TTX มีความสามารถสูงกว่าสารอนุพันธ์ anhydro-TTX และการตรวจหาแอคติวิตีของสารในกรณีนี้ใช้วิธี tissue culture assay ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาสารทั้งหมดที่มีกลไกในการกีดขวางช่องโซเดียม แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าสารเหล่านั้นประกอบด้วยสารชนิดใดบ้างและมีปริมาณเท่าใด ดังนั้นการที่พบแอคติวิตีของสารกีดขวางช่องโซเดียมสูงในช่วงเวลาใดจึงคาดว่า จะมีสารอนุพันธ์ TTX ในอัตราส่วนที่สูงกว่าอีกอนุพันธ์หนึ่ง ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์เพื่อยืนยันด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ซึ่งผลการวิเคราะห์จะได้กล่าวต่อไป



รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและปริมาณสารพิษนอกช่องโซเดียม เมื่อคิดเป็นสาร TTX ของ Vibrio sp. หมายเลข 11 เมื่อบ่มเชื้อที่ 28° ซ ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 264 ชม.

- ■ TTX ในสารสกัดจากเซลล์
- ▨ TTX ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว
- □ TTX รวม
- ■—■ การเจริญ

ข. สภาวะที่ไม่มีการเขย่า

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากเซลล์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วโดยคิดเป็นสาร TTX ในช่วงเวลาต่างๆของการบ่มเชื้อที่ 28°ซ โดยไม่มีการเขย่านาน 264 ชม.

เวลาที่บ่ม (ชม.)	สารสกัดจากเซลล์		อาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว		TTX รวม (นาโนกรัมต่อ มล.)
	tissue culture assay (ร้อยละ)	TTX(นาโนกรัมต่อ มล.)	tissue culture assay (ร้อยละ)	TTX(นาโนกรัมต่อ มล.)	
12	22.68	0.126	–	–	0.126
24	39.99	0.226	–	–	0.226
48	51.52	0.522	–	–	0.522
72	26.80	0.224	–	–	0.224
96	31.94	0.299	–	–	0.229
120	26.21	0.225	22.37	0.489	0.714
144	53.80	0.564	21.55	0.510	1.074
168	19.96	0.256	24.52	1.174	1.430
192	47.08	0.509	23.73	0.960	1.469
216	27.97	0.668	21.71	0.795	1.463
240	–	–	–	–	
264	–	–	–	–	

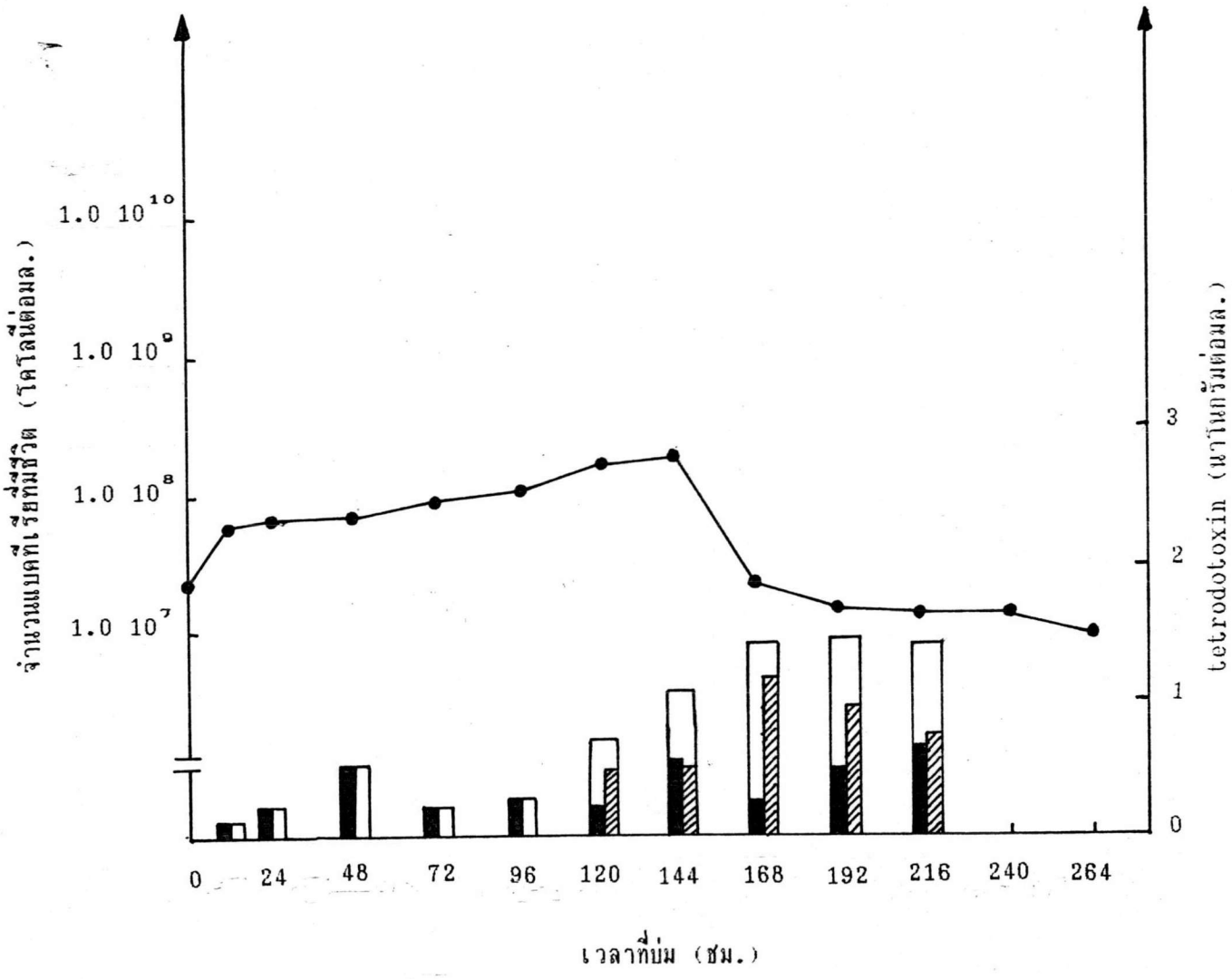
* หมายถึงร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิต

\- หมายถึงไม่พบ

จากผลการทดลองในตารางที่ 8 พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า Vibrio sp. หมายเลข 11 จะสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในเซลล์ตั้งแต่ ชม.ที่ 24 ของการบ่ม และมีปริมาณเปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาของการบ่มเช่นเดียวกัน เมื่อตรวจสอบโดยวิธี tissue culture assay โดยมีปริมาณสูงขึ้นในชม.ที่ 48 จากนั้นจะลดลงเมื่อถึง ชม.ที่ 72 เป็นต้นไป จนถึงชม.ที่ 120 จากนั้นจะเพิ่มขึ้นและลดลงอีก เมื่อถึงชม.ที่ 216 จะเพิ่มขึ้นและตรวจไม่พบในชม.ที่ 240 ถึง 264 สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเริ่มพบแอคติวิตีของสารได้ตั้งแต่ชม.ที่ 120 ไปจนถึงชม.ที่ 216 ของการบ่มโดยมีค่าเปลี่ยนแปลงไปเช่นเดียวกัน เมื่อนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อคิดเป็นสาร TTX (รูปที่ 15) จะพบว่ามีปริมาณสารสูงสุดเมื่อแบคทีเรียอยู่ในระยะการเจริญลด (ชม. ที่ 192 ถึง 216) และการที่ปริมาณสารในสารสกัดจากเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาของการบ่ม อาจใช้เหตุผลอธิบายได้เช่นเดียวกับในกรณีที่บ่มเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า กล่าวคือ เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX ซึ่งสารทั้งสองมีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมไม่เท่ากัน ซึ่งควรยืนยันเหตุผลดังกล่าวโดยวิเคราะห์สาร ด้วยวิธี HPLC ต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม ที่สร้างโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งสองสภาวะการบ่มเชื้อพบว่า สภาวะที่มีการเขย่าแบคทีเรียจะสร้างสารในปริมาณที่สูงกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

และเพื่อเป็นการยืนยันถึงเหตุผลที่นำมาอธิบายถึง การที่ปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียมเปลี่ยนแปลงไปในช่วงของการบ่มเชื้อ จึงได้นำสารสกัดจากเซลล์บางช่วงเวลาของการบ่มในสภาวะที่มีการเขย่า ได้แก่ ชม.ที่ 72,120,144,192 และ 240 โดยนำสารมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยคอลัมน์ เซพแพค ซี 18 (Sep Pak C18 cartridge) และกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ขนาดช่อง 0.45 ไมครอน และวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและปริมาณสารกัดขวางช่องโซเดียม เมื่อคิดเป็นสาร TTX ของ Vibrio sp. หมายเลข 11 เมื่อบ่มเชื้อที่ 28° ซ ในสภาวะที่มีการเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 264 ชม.

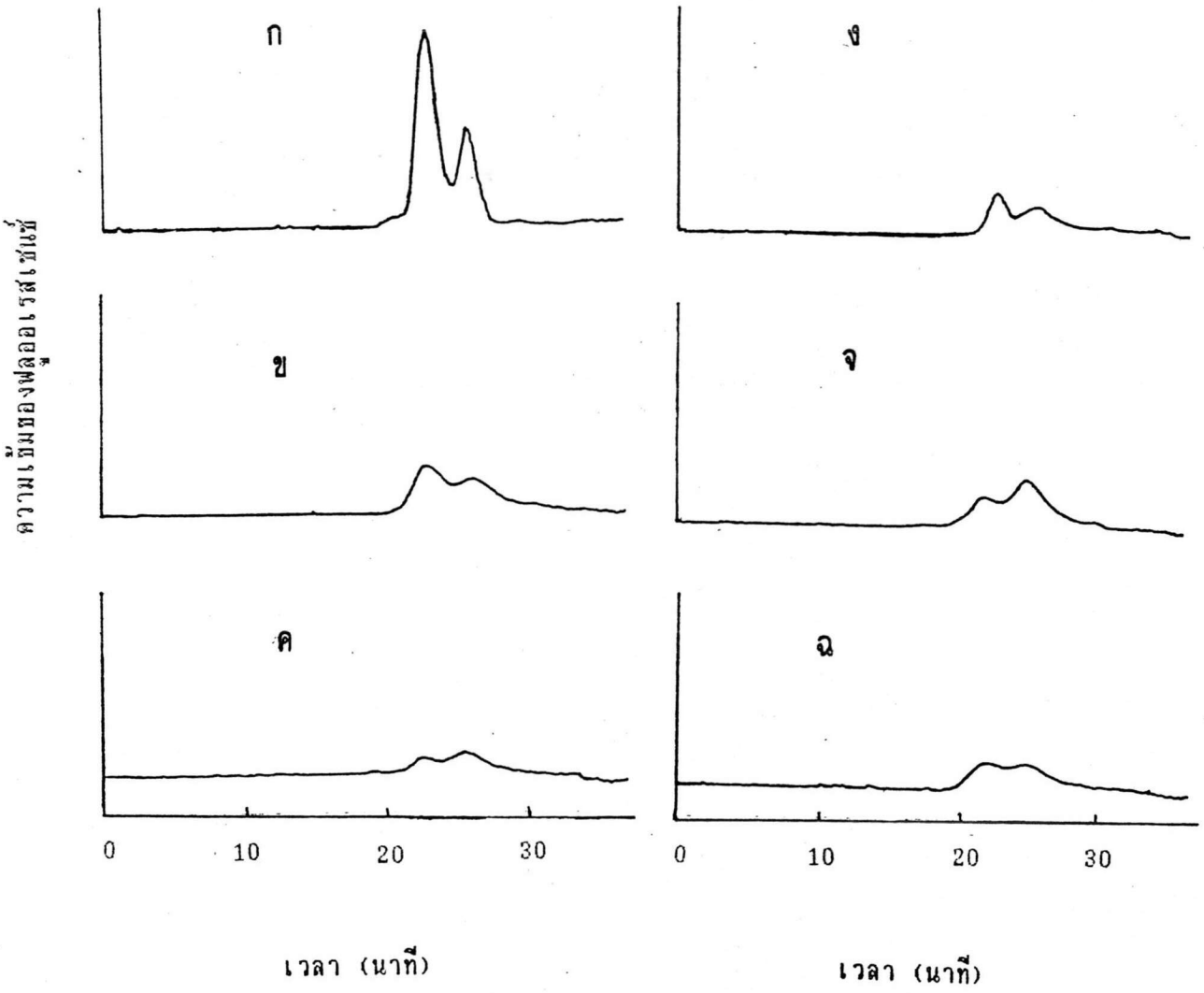
■ TTX ในสารสกัดจากเซลล์

▨ TTX ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว

□ TTX รวม

●—● การเจริญ

รูปที่ 16 แสดงโครมาโตแกรมของไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์สารกึ่งกลางช่องโซเดียมในสารสกัดจากเซลล์ช่วงเวลาต่างๆของการบ่มเชื้อ สภาวะที่มีการเขย่า โดยใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs



ก โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานผสม TTX และ anhydro-TTX

ข โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง (บ่มเชื้อ 72 ชม.)

ค โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง (บ่มเชื้อ 120 ชม.)

ง โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง (บ่มเชื้อ 144 ชม.)

จ โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง (บ่มเชื้อ 192 ชม.)

ฉ โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง (บ่มเชื้อ 240 ชม.)

จากโครมาโตแกรมที่ได้พบว่า ในสภาวะที่มีการเขย่า แบคทีเรีย Vibrio sp. หมายเลข 11 จะสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX โดยมีอัตราส่วนของสารทั้งสองเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการบ่มเชื้อ และเนื่องจากสารอนุพันธ์ TTX มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงกว่าสารอนุพันธ์ anhydro-TTX ดังนั้นในช่วงเวลา ที่ให้ค่าร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิต ในการทำ tissue culture assay สูง จะมีอัตราส่วนของสาร TTX มากกว่าสาร anhydro-TTX ตัวอย่างเช่น ในช่วงการบ่มเชื้อที่ 72 ชม. (รูปที่ 16 ข) ส่วนในชม.ที่ 120 จะพบว่ามีอัตราส่วนของสาร anhydro-TTX มากกว่าสาร TTX ซึ่งสอดคล้องกับผลของ tissue culture assay

ส่วนในสภาวะที่ไม่มีการเขย่านั้น คาดว่าเป็นไปในทำนองเดียวกับสภาวะที่มีการเขย่า (ไม่ได้แสดงผลไว้)