



พิษของปลาปักเป้าน้ำจืด
TOXINS OF FRESHWATER
PUFFER FISH

อัยยา กิ่งสุวรรณ และคณะ
Attaya Kungsuwan *et. al.*

เอกสารทางวิชาการ ฉบับที่ 11/2539

สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

กรมประมง

Technical Paper No. 11/1996

Fishery Technological Development Institute

Department of Fisheries

สารบัญ

	หน้า
รายชื่อตาราง	i
รายชื่อรูป	ii
บทคัดย่อ	1-2
คำนำ	3
อุปกรณ์และวิธีการ	4
ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล	8
สรุปผลการศึกษา	22
เอกสารอ้างอิง	26

รายชื่อตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา <i>Tetraodon leirus</i> type 1 ที่จับจากอ่างเก็บน้ำพาน อำเภอสร้างคอม จังหวัดอุดรธานี	9
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา <i>Tetraodon leirus</i> type 1 หลังจากเลี้ยงนาน 1 เดือนและ 3 เดือน	11
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา <i>Tetraodon leirus</i> type 2 ที่จับจากอ่างเก็บน้ำพาน อำเภอสร้างคอม จังหวัดอุดรธานี	12
ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา <i>Tetraodon leirus</i> type 1 และ type 2 ที่จับจากอ่างเก็บน้ำท่ามะนาว อำเภอบ้านดุง จังหวัดอุดรธานี	13
ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา <i>Tetraodon suvatii</i> ที่จับจากอ่างเก็บน้ำพาน อำเภอสร้างคอม จังหวัดอุดรธานี	14
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา <i>Tetraodon leirus</i> type 1 ที่จับจากอ่างเก็บน้ำลำทวน อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร	15
ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา <i>Tetraodon leirus</i> type 1 ที่จับจากแม่น้ำชี อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร	16
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา <i>Tetraodon fangi</i> ที่จับจากแม่น้ำชี อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร	17

รายชื่อรูป

	หน้า
รูปที่ 1. <i>Tetraodon leirus</i> Bleeker (type 1)	I
รูปที่ 2. <i>Tetraodon leirus</i> Bleeker (type 2)	I
รูปที่ 3. <i>Tetraodon suvatii</i> (side view)	II
รูปที่ 4. <i>Tetraodon suvatii</i> (top view)	II
รูปที่ 5. <i>Tetraodon fangi</i> Pellegrin & Chevey	III
รูปที่ 6. <i>Tetraodon nigroviridis</i> Marion de Proce	III
รูปที่ 7. <i>Tetraodon steindachneri</i> Dekkers	IV
รูปที่ 8. รูปแสดงลักษณะสำคัญของปลาปักเป้าวงศ์ Tetraodontidae ที่มีฟัน 4 ซี่	IV
รูปที่ 9. แสดงค่าเฉลี่ยของพิษในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของ <i>Tetraodon leirus</i> type 1 ที่จับจากจังหวัดอุดรธานี ในเดือนต่าง ๆ (2538 - 2539)	10
รูปที่ 10. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของพิษประเภท saxitoxin group ในพิษของปลา <i>Tetraodon leirus</i> type 1 โดยเครื่อง HPLC	18
รูปที่ 11. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของพิษประเภท gonyautoxin group ในพิษของปลา <i>Tetraodon leirus</i> type 1 โดยเครื่อง HPLC	19
รูปที่ 12. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของพิษประเภท saxitoxin group ในพิษของปลา <i>Tetraodon suvatii</i> โดยเครื่อง HPLC	20
รูปที่ 13. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของพิษประเภท gonyautoxin group ในพิษของปลา <i>Tetraodon suvatii</i> โดยเครื่อง HPLC	21
รูปที่ 14. แสดงสูตรโมเลกุลของพิษอัมพาต Paralytic shellfish poison (PSP) และ tetrodotoxin (TTX)	23

พิษของปลาปักเป้าน้ำจืด

TOXINS OF FRESHWATER PUFFER FISH

อธยา กังสุวรรณ¹⁾ มนุน พรหมเดช¹⁾ โอซามุ อาระคาวา²⁾ และ โยชิโอะ โอนิอุเอะ²⁾

¹⁾ สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง (ตี๊กปลอดประสพ) เกษตรกลาง
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

²⁾ คณะประมง มหาวิทยาลัยคาโกชิม่า 4-50-20 ชิโมะราตะ คาโกชิม่า 890 ประเทศญี่ปุ่น

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาความเป็นพิษของปลาปักเป้าน้ำจืด *Tetraodon leiurus* complex (type 1 และ type 2), *T. suvatii*, และ *T. fangi* ที่จับจากอ่างเก็บน้ำจังหวัดอุดรธานีและจังหวัดยโสธร ในระหว่างเดือนพฤษภาคม 2538 ถึง กันยายน 2539 รวมทั้ง *T. nigroviridis* และ *T. steindachneri* ที่ซื้อจากสวนจตุจักร กรุงเทพฯ ทั้งนี้ ทำการทดสอบพิษโดยใช้หนูทดลองและรวบรวมเนื้อเยื่อที่พบว่ามีพิษมาสกัดพิษและทำให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วนโดยใช้เครื่องกรองแบบอูลตรา (Ultrafiltration, Amicon YM1) แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu, LC10) โดยใช้คอลัมน์ LiChroCART Superspher RP-18(e) ขนาด 0.4x25 ซม. (Merck) ผลจากการทดสอบพิษปรากฏว่า ปลาทุกชนิดที่นำมาตรวจมีความเป็นพิษในทุกส่วนของเนื้อเยื่อ โดยพบพิษสูงสุด (1, 250 MU/g) ในหนังของ *T. leiurus* ที่จับมาจากจังหวัดยโสธร ผลของ HPLC แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบพิษของปลาปักเป้าน้ำจืดทุกชนิดเป็นพิษในกลุ่มพิษอัมพาต (Paralytic shellfish poison : PSP) กล่าวคือ saxitoxin, neosaxitoxin และ decarbamoyl saxitoxin ซึ่งผลิตจากปลาปักเป้าน้ำเค็มที่เป็น tetrodotoxin (TTX) ดังที่เคยมีรายงานมาแล้ว

TOXINS OF FRESHWATER PUFFER FISH

Attaya Kungsuwan¹⁾, Manoon Promdet¹⁾, Osamu Arakawa²⁾ and Yoshio Onoue²⁾

¹⁾ Fishery Technological Development Institute, Department of Fisheries
(Plodprasop Bldg.), Kaset Klang, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

²⁾ Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 4-50-20 Shimoarata, Kagoshima
890, Japan

Astract

Studies on toxicity of freshwater puffers fishes were performed. The specimens of freshwater puffer fish namely: *Tetraodon leiurus* complex (type 1 and type 2), *T. suvatii* and *T. fangi* were collected from the reservoirs in Udonthani and Yasothon provinces from May 1995 to September 1996. In addition, the specimens of *Tetraodon nigroviridis* and *T. steindachneri* were purchased from Chatuchak market. All specimens were analysed for toxicity by mouse bioassay. Bioassay results showed that all tissue samples of all kinds of puffers tested were toxic. The highest toxicity was found in the skin (1,250 MU/g) of a *T. leiurus* from Yasothon province. Toxic tissues were pooled and partially purified by ultrafiltration (Amicon, YM1). The toxic fraction obtained was then subjected to HPLC (Shimadzu) completed with LiChroCART Superspher RP-18(e) column (0.4 x 25 cm, Merck). The results of HPLC also showed that toxins of freshwater puffers were composed of paralytic shellfish poisons (PSP) rather than tetrodotoxin (TTX) which normally found in marine puffer fish. The PSP components found were saxitoxin, neosaxitoxin and decarbaboysaxitoxin.

คำนำ

ในประเทศญี่ปุ่น เนื้อปลาปักเป้าเป็นอาหารที่ราคาแพงและเป็นที่ยอมรับ การเปิดดำเนินกิจการภัตตาคารอาหารประเภทปลาปักเป้าต้องมีใบอนุญาตเฉพาะเพื่อเลี่ยงการเกิดอาหารเป็นพิษเนื่องจากบริโคคปลาปักเป้า ทั้งนี้ การเกิดอาหารเป็นพิษเนื่องจากบริโคคปลาปักเป้าในประเทศญี่ปุ่นนั้น มีรายงานมาเกือบ 100 ปีแล้ว¹⁾ นับตั้งแต่นั้นมา ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ในปลาปักเป้าน้ำเค็ม และพบว่าปลาปักเป้าบางชนิดที่อยู่ในวงศ์ *Tetraodontidae* มีความเป็นพิษ ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มเติมและพบว่าพิษนั้นเป็นพิษที่เรียกว่า tetrodotoxin หรือ TTX ซึ่งมีผลต่อระบบประสาท โดยทำให้เกิดอาการชา จึงเรียกกันว่าพิษอัมพาต นอกจากนี้ การทำการสำรวจในประเทศญี่ปุ่นชี้ให้เห็นว่าปลาปักเป้าทะเลมีทั้งชนิดที่เป็นพิษและปลอดภัยต่อการบริโภค ซึ่งตามภัตตาคารสามารถนำเอาไปปรุงอาหารจำหน่ายได้

ในประเทศไทย มีการบริโภคปลาปักเป้าน้ำเค็มกันมาตั้งแต่ในอดีต และการเกิดอาหารเป็นพิษเนื่องจากบริโคคปลาปักเป้าเหล่านี้ มีรายงานบ้างเป็นครั้งคราว ทั้งนี้เป็นเพราะคนไทยไม่ได้มีนิสัยในการบริโภคปลาปักเป้ามานัก²⁾ อนึ่ง ได้มีการสำรวจและตรวจติดตามปลาปักเป้าทะเลที่มีพิษในน่านน้ำไทยไปบ้างแล้วเช่นกัน ผลที่ได้ปรากฏว่า ในจำนวนปลาปักเป้าที่ทำการศึกษา 13 ชนิด มีชนิดที่ไม่เป็นพิษ 6 ชนิด และชนิดที่เป็นพิษ 7 ชนิด⁸⁻⁹⁾ ชนิดที่เป็นพิษบางชนิดถูกนำมาศึกษาต่อว่าเป็นพิษชนิดใด ซึ่งผลปรากฏว่าเป็นพิษประเภท tetrodotoxin ทำนองเดียวกับปลาปักเป้าทะเลของญี่ปุ่น โดยชนิดที่นำมาศึกษาได้แก่ *Arothron mappa* และ *Lagocephalus inermis*¹⁰⁾

เมื่อเร็วๆ นี้ เป็นที่แปลกใจกันมากถึงรายงานของการเกิดอาหารเป็นพิษเนื่องจากบริโคคปลาปักเป้าน้ำจืดที่ก่อกำเนิดขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจังหวัดแถบตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ตามการบอกเล่าของคนท้องถิ่น พบว่ามีการบริโภคปลาปักเป้าน้ำจืดกันมานานนับ 50 ปีแล้ว แต่ไม่มีรายงานความเป็นพิษดังเช่นในปัจจุบันนี้ การเกิดความเป็นพิษดังกล่าวนี้ ดูเหมือนจะเพิ่งเกิดขึ้น นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาทางด้านการจำแนกชนิดปลาและพบว่าในประเทศไทยมีปลาปักเป้าน้ำจืดอยู่ทั้งสิ้น 9 ชนิด ส่วนใหญ่จะอยู่ในวงศ์ *Tetraodontidae*¹¹⁾

ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการสำรวจและตรวจติดตามความเป็นพิษของปลาปักเป้า น้ำจืด เพื่อที่จะได้รู้ชนิดปลาที่เป็นพิษและเพื่อวิเคราะห์ว่าพิษนั้นเป็นสารพิษประเภทใด นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความเป็นพิษตามฤดูกาลและตามแหล่งที่เก็บตัวอย่างด้วย เช่นกัน ผลการศึกษาที่ได้จะนำมาเผยแพร่ให้ประชาชนได้มีความรู้และความเข้าใจต่อปลาปักเป้า น้ำจืดให้ดียิ่งขึ้น และระมัดระวังในการเอาปลาปักเป้ามารับประทาน เพื่อที่จะได้เป็นการคุ้มครองผู้บริโภคได้อีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างปลาปักเป้า

ปลาปักเป้าน้ำจืด 3 ชนิดคือ *Tetraodon leiurus* complex ซึ่งมีสองประเภทคือ type 1 และ type 2 โดยต่างกันตรงจุดข้างตัว ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 และ *Tetraodon suvatii* (รูปที่ 3 - 4) และ *T. fangi* (รูปที่ 5) จับจากอ่างเก็บน้ำพาน อำเภอสร้างคอม และอ่างเก็บน้ำท่ามะนาว อำเภอบ้านดุง จังหวัดอุดรธานี (สำหรับ *T. suvatii* นั้น จับได้จากอ่างเก็บน้ำพาน อำเภอสร้างคอม จังหวัดอุดรธานีเพียงแห่งเดียว) และจากอ่างเก็บน้ำลำทวน อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร และแถบแม่น้ำชีในจังหวัดยโสธรด้วย โดยเก็บตัวอย่างในระหว่างเดือน มีนาคม 2538 ถึงเดือนกันยายน 2539 ทั้งนี้ ในการเก็บตัวอย่างไม่สามารถกำหนดเดือนแน่นอนได้เพราะ บางเดือนมีปัญหาหน้าท่วม ทำให้เข้าไปเก็บตัวอย่างไม่ได้ และในการเก็บตัวอย่างต้องว่าจ้างชาว ประมงให้วางแห หรือเหวี่ยงอวนเพื่อจับปลาให้ จึงขึ้นอยู่กับขนาดตาอวนที่ชาวประมงใช้ในแต่ละ เดือน ถ้าตาถี่จะจับพวก *T. suvatii* ที่มีขนาดใหญ่ไม่ได้ แต่อาจได้ *T. leiurus* มาก บางเดือน อาจจับไม่ได้เลย เหล่านี้เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างของ *Tetraodon nigroviridis* (รูปที่ 6) และ *T. steindachneri* (รูปที่ 7) ซึ่งซื้อมาจากร้านขายปลาสวยงามในตลาดจตุจักร กรุงเทพฯ เพื่อนำมาศึกษาพร้อมด้วย ทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นเป็นปลาในวงศ์ *Tetraodontidae* ซึ่งมีลักษณะเด่นเป็นพิเศษคือมีฟัน 4 ซี่ ดังแสดงในรูปที่ 8

สำหรับตัวอย่างที่นำมาจากจังหวัดอุดรธานีและจังหวัดยโสธรนั้น จะแช่น้ำแข็ง กลับมาที่สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรุงเทพฯ แล้วจึงเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -30° C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์พิษ และมีบางส่วนที่นำกลับมาในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วย เพื่อนำมาทดลองเลี้ยงและดูการเปลี่ยนแปลงของความเป็นพิษ การทดลองเลี้ยงทำให้ตู้เลี้ยงปลาขนาด 15 ลิตร โดยใช้น้ำประปาและไร่น้ำเป็นอาหาร ส่วนตัวอย่างที่ซื้อมาจากตลาดจตุจักรนั้น จะทำการวิเคราะห์ทันที

การวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลอง (Mouse bioassay)

ตัวอย่างปลาที่นำมาวิเคราะห์ถูกตัดแยกชิ้นเนื้อเยื่อออกเป็นเนื้อ หนึ่ง ดับ ไข่และลำไส้ เพื่อนำไปสกัดพิษต่อไป อนึ่ง เหตุที่ทำการวิเคราะห์เฉพาะในเนื้อเยื่อที่กล่าวข้างต้น เพราะเป็นส่วนที่คนนำเอามาบริโภคเป็นส่วนใหญ่ โดยการบั้ง ต้มทั้งตัวติดหนัง ซึ่งพิษสามารถทนความร้อนและละลายน้ำปนอยู่ในน้ำซุ๊ปได้ จึงทำในแง่คุ้มครองผู้บริโภค นอกจากนี้ การวิเคราะห์พิษแต่ละครั้งในปลาปักเป้าแต่ละตัว และในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดต้องใช้หนูอย่างน้อยที่สุด 3 ตัวในการวิเคราะห์ ดังนั้น ถ้าทำการวิเคราะห์ในเนื้อเยื่อ 4 ชนิดในปลาหนึ่งตัว ต้องใช้หนูถึง 12 ตัว ดังนั้นจึงเลือกทำในเนื้อเยื่อที่จำเป็นที่สุดเท่านั้น เพื่อเป็นการประหยัดการใช้หนูด้วย

นอกจากนี้ ตามรายงานการพบพิษในปลาปักเป้าทะเลนั้น ระบุว่าพิษที่พบในปลาปักเป้าทะเลนั้นชื่อ เทโทรโดท็อกซิน (tetrodotoxin) ดังนั้น ในการวิเคราะห์ครั้งแรก การสกัดพิษจึงใช้วิธีของ Kawabata (1978)¹²⁾ ซึ่งเป็นวิธีโดยทั่วไปเพื่อสกัดพิษชนิดเทโทรโดท็อกซิน โดยดัดแปลงเล็กน้อย กล่าวโดยย่อคือ เนื้อเยื่อแต่ละส่วนถูกสกัดโดยใช้กรดน้ำส้ม 0.1% ในอัตราส่วน 1: 3 (น้ำหนัก:ปริมาตร) หลังจากคนให้เข้ากันแล้ว นำมาต้มในอ่างน้ำเดือดประมาณ 10 นาที เมื่อทำให้เย็นแล้วจึงนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง (3, 000 รอบต่อนาที) ประมาณ 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ 1 มิลลิลิตรฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูขาว ตัวผู้ สายพันธุ์ IRC ที่มีน้ำหนักตัวระหว่าง 18 - 20 กรัม ฝ้าดูอาการของหนูและจดบันทึกช่วงการตาย แล้วจึงนำมาคำนวณปริมาณความเป็นพิษโดยใช้ตารางมาตรฐานของเทโทรโดท็อกซินหรือ TTX ต่อไป (Dose Death Time Table for TTX)¹²⁾

ต่อมา จากการใช้วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวข้างต้นจนสามารถรวบรวมตัวอย่างที่มีพิษไว้ได้บ้าง และหลังจากที่ได้นำส่วนที่สกัดพิษได้มาทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อดูองค์ประกอบของพิษโดยใช้ HPLC (High performance liquid chromatography) แล้ว ผลปรากฏว่าองค์ประกอบพิษไม่ใช่เทโทรโดท็อกซินดังที่เข้าใจ แต่เป็นพิษประเภท PSP : Paralytic shellfish poison (ซึ่งจะกล่าวในตอนหลัง) ดังนั้น การคำนวณและการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูหลังจากนี้จะทำโดยใช้วิธีสำหรับการวิเคราะห์ PSP ตามวิธีของ AOAC¹³⁾ โดยใช้กรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มัลเป็นสารสกัดพิษ และมีวิธีการสกัดคล้ายคลึงกับวิธีการสกัดเทโทรโดท็อกซิน แต่ใช้ตารางมาตรฐานของ PSP ในการประเมินค่าความเป็นพิษแทน ซึ่งจะใช้วิธีนี้ต่อไปตลอดการศึกษานี้

การทำสารพิษให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วน (Partial purification)

การทำสารพิษให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วนมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดสารโมเลกุลใหญ่ๆ ออกไป ทำให้สารพิษที่สกัดมาได้สะอาดมากขึ้นก่อนที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งจะทำให้ผลการวิเคราะห์ดียิ่งขึ้น ดำเนินการโดย นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เป็นพิษแต่ละส่วน (เนื้อ ตับ หนังกและไข่) จากตัวอย่าง *T. leiurus* type 1 และ *T. suvatii* ชนิดละ 3 ตัว มารวมกันและใช้ส่วนละ 5 กรัม เพื่อสกัดพิษโดยใช้กรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนัก:ปริมาตร) แล้วนำมาต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที หลังจากทำให้เย็นแล้วจึงนำเข้าเครื่องเหวี่ยง (5,000 รอบต่อนาที) นาน 10 นาที ส่วนใสที่ได้ถูกนำมากรองโดยใช้เครื่องกรองระบบอัลตรา (Ultrafiltration, Amicon, YM1 membrane) ซึ่งมีการจำกัดการกรองผ่านถึง 1,000 ดาลตัน (cut-off limit) นำสารละลายที่กรองได้นี้มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพิษทั้งในรูป TTX และ PSP โดยใช้ HPLC เพื่อดูว่าจะมีองค์ประกอบพิษประเภทใด ดังรายละเอียดต่อไปนี้

Reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพิษทำโดยใช้เครื่อง HPLC ของ Shimadzu (LC-10) คอลัมน์ที่ใช้คือ LiChroCART Superspher RP-18(e) ขนาด 0.4 x 25 ซม.(Merck) และใช้ Fluorescence detector (RF-10AXL) สารละลายต่างๆ ที่ใช้มีดังต่อไปนี้¹⁴⁻¹⁶⁾

1. สารละลาย Mobile phase ของ HPLC แบ่งออกเป็นสองส่วนดังต่อไปนี้

- สำหรับกลุ่ม saxitoxin (STXs) ของ PSP ใช้ 2 mM heptanesulfonic acid (HSA) และ 4% acetonitrile ใน 30 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.3) และ

- สำหรับ TTX และ gonyautoxin (GTXs) ใช้ 2mM HSA ใน 10mM ammonium phosphate buffer (pH 7.3)

2. สารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบหลังจากสารพิษผ่านคอลัมน์ของ HPLC แล้ว (detection reagent of post-column unit) คือ

- สำหรับ PSP ใช้สาร 2 ชนิดคือ

1) 0.05M periodic acid

2) 2N KOH : 2.5M ammonium formate : formamide (10:40:50)

ใช้ความยาวคลื่นในการวิเคราะห์คือ excitation = 336 nm และ emission = 392 nm ที่อุณหภูมิ 65° C

- สำหรับ TTX ใช้สารชนิดเดียวคือ 4N NaOH และใช้ความยาวคลื่น

excitation = 384 nm และ emission = 505 nm ที่อุณหภูมิ 110° C

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

ผลของการวิเคราะห์พิษ จะรายงานเป็นหน่วย MU/g หรือ Mouse unit/gram ของเนื้อเยื่อ ทั้งนี้ 1 MU/g คือ ปริมาณพิษต่ำสุดที่สามารถฆ่าหนูขาวตัวผู้ น้ำหนัก 20 กรัมให้ตายได้ภายใน 15 นาที (กรณีของ PSP) และผลที่แสดงในตารางต่างๆ ต่อไปนี้ เป็นผลจากการฉีดหนู 3 ตัว ซึ่งให้ผลแตกต่างกันไม่เกิน + 5 MU ซึ่งถ้าต่างไปมากกว่านี้จะทำการฉีดใหม่ ทั้งนี้เป็นเพราะหนูแต่ละตัวจะมีความไวต่อพิษไม่เท่ากัน ดังนั้นเพื่อเป็นการควบคุม ต้องใช้หนูที่มีขนาดหรือน้ำหนักตัวใกล้เคียงกันระหว่าง 18 - 20 กรัม และไม่ใช้หนูที่ขนาดใหญ่หรือน้ำหนักเกิน 22 กรัม

ตารางที่ 1 แสดงผลของการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองของ *Tetraodon leiurus* type 1 ที่จับจากอ่างเก็บน้ำพาน อำเภอสร้างคอม จังหวัดอุดรธานี ซึ่งพบพิษในเนื้อเยื่อทุกส่วนของตัวอย่างของเดือนพฤษภาคม 2538 โดยมีค่าความเป็นพิษสูงสุดในไข่คือ 117 MU/g และความถี่ของการพบพิษได้ลดลงในเดือนถัดมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่อส่วนเนื้อของเดือนสิงหาคม และ ตุลาคม 2538 นั้น จากตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวไม่พบความเป็นพิษเลย แต่ยังพบในหนังและไข่อู้ง้างในอัตราส่วนที่ต่ำ โดยพิษสูงสุดที่พบในไข่มีเพียง 23 MU/g แต่เมื่อมาถึงเดือนมิถุนายน 2539 ความถี่ของการพบพิษก็กลับเพิ่มขึ้นมาเป็นพบในทุกส่วนของเนื้อเยื่อของทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์อีกครั้ง พิษสูงสุดที่พบคือ 100 MU/g ในหนัง อนึ่ง พบพิษในหนังในความถี่สูงสุด คือประมาณ 72% ของตัวอย่างทั้งหมด และพบในเนื้อในความถี่ต่ำสุดคือ 45% การที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะขึ้นอยู่กับปลาแต่ละตัวว่าจะสร้างสารพิษเมื่อไร เพื่อจุดประสงค์อะไร ซึ่งข้อนี้ยังเป็นข้อที่ต้องมีการศึกษาให้ละเอียดลงไปอีก ในอนาคต

นอกจากนี้ในแง่ของการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลนั้น ในรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าปลาจะมีพิษต่ำสุดในระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง ตุลาคม กล่าวคือไม่พบพิษในเนื้อและตับเลย และพบพิษของทุกเนื้อเยื่อในช่วงเดือนพฤษภาคม กรกฎาคม 2538 และมิถุนายน 2539 ส่วนเนื้อเยื่อที่พบพิษทุกเดือนที่เก็บตัวอย่างมาคือหนัง โดยจะมีพิษสูงสุดในเดือนพฤษภาคม 2538 และรองลงมาคือในเดือนมิถุนายน 2539 โดยจะได้มีการศึกษาติดตามอย่างต่อเนื่องต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลชัดเจนกว่านี้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างขนาดปลาและความรุนแรงของพิษ

ตารางที่ 1. ผลการวิเคราะห์พิษโดยใช้หนูทดลองในปลา *Tetraodon leirus* type 1 ที่จับจาก
อ่างเก็บน้ำพาน อำเภอสร้างคอม จังหวัดอุดรธานี

วันที่เก็บตัวอย่าง	ลำดับของ ตัวอย่าง	น้ำหนักตัว (กรัม)	ความยาว (ซม.)	ความเป็นพิษ (MU/g)			
				เนื้อ	หนัง	ตับ	ไข่
24 พ.ค. 2538	1	19	9	24	44	32	24
	2	21	9	74	99	67	67
	3	19	9	51	50	58	59
	4	22	9	64	65	60	77
	5	23	9	61	75	74	NA
	6	25	9	48	33	19	NA
	7	22	9	51	81	90	117
26 ก.ค. 2538	1	23	11	36	19	ND	66
	2	24	11	67	170	64	73
	3	19	10	ND	20	25	11
	4	18	10	ND	ND	ND	ND
	5	29	11	ND	ND	ND	41
	6	17	10	11	14	48	70
	7	14	10	ND	ND	ND	34
	8	10	8	ND	ND	ND	ND
	9	14	9	ND	39	49	27
25 ส.ค. 2538	1	17	9	ND	ND	ND	ND
	2	17	9	ND	ND	ND	ND
	3	19	9	ND	10	ND	23
	4	21	9	ND	ND	ND	ND
8 ต.ค. 2538	1	16	8	ND	7	ND	NA
	2	18	9	ND	5	ND	NA
	3	23	9	ND	6	ND	NA
	4	23	9	ND	ND	ND	NA
	5	23	9	ND	5	ND	NA
	6	20	9	ND	5	ND	ND
	7	19	8	ND	ND	ND	NA
	8	17	8	ND	6	ND	ND
26 มี.ย. 2539	1	15	9	10	36	11	26
	2	15	9	15	5	21	13
	3	21	8	10	12	10	NA
	4	18	9	58	100	26	11
	5	23	9	43	57	16	19

หมายเหตุ : ND = non-detected (ไม่พบพิษ) NA = not assayed (ไม่ได้วิเคราะห์เพราะไม่มีตัวอย่างเนื้อเยื่อ)