การเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลของการสะสมกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* บริเวณเกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี

นางสาวทิพวรรณ ยอดยิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEASONAL VARIATIONS OF DOMOIC ACID ACCUMULATION IN SPINY OYSTER *Spondylus* cf. *versicolor* AT KHAM YAI ISLAND, CHONBURI PROVINCE

Miss Tippawan Yotying

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Marine Science
Department of Marine Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลของการสะสมกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* บริเวณเกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี
โดย	นางสาวทิพวรรณ ยอดยิ่ง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา วัฒยากร)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. เชษฐพงษ์ เมฆสัมพันธ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทิพวรรณ ยอดยิ่ง: การเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลของการสะสมกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* บริเวณเกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี (SEASONAL VARIATIONS OF DOMOIC ACID ACCUMULATION IN SPINY OYSTER *Spondylus* cf. *versicolor* AT KHAM YAI ISLAND, CHONBURI PROVINCE)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, 116 หน้า.

กรดโดโมอิก (domoic acid) เป็นสาเหตุของ amnesic shellfish poisoning (ASP) ที่ผลิตโดยไดอะตอมหลายชนิด เช่น *Pseudo-nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp. พิษของกรดโดโมอิกสะสมในหอยที่กรองกินแพลงก์ตอนพืชที่สร้างพิษเป็นอาหาร และถ่ายทอดพิษไปตามห่วงโซ่อาหารสู่ผู้บริโภค เช่น มนุษย์ได้ จึงทำการศึกษาการสะสมกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล บริเวณเกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี จำนวน 2 สถานี ในฤดูลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ และฤดูลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ด้วยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) พบว่ากรดโดโมอิกในหอยนางรมหนามของทั้งสองสถานีมีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม โดยพบในอวัยวะส่วน digestive gland มากที่สุด สำหรับปริมาณกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลพบมากสุดเดือนพฤษภาคมเช่นกัน โดยพบว่าในสถานี 1 ที่ระดับ 0.5 เมตร จากผิวน้ำทะเล แพลงก์ตอนพืชขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร และขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร มีปริมาณกรดโดโมอิก 1.01± 0.03 และ 0.54 ± 0.02 นาโนกรัม/ลิตร ตามลำดับ และที่ระดับ 0.5 เมตร จากพื้นทะเล แพลงก์ตอนพืชขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร และขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร มีปริมาณกรดโดโมอิก 0.80 ± 0.09 และ 0.86 ± 0.03 นาโนกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในสถานี 2 ที่ระดับ 0.5 เมตร จากผิวน้ำทะเล แพลงก์ตอนพืชขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร และขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร มีปริมาณกรดโดโมอิก 0.96 ± 0.01 และ 1.20 ± 0.08 นาโนกรัม/ลิตร ตามลำดับ และที่ระดับ 0.5 เมตร จากพื้นทะเล แพลงก์ตอนพืชขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร และขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร มีปริมาณกรดโดโมอิก 0.98 ± 0.03 และ 0.93 ± 0.03 นาโนกรัม/ลิตร ตามลำดับ สำหรับผลการตรวจหากรดโดโมอิกด้วย HPLC พบว่าไม่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิก ผลการศึกษาด้วยวิธี ELISA แสดงให้เห็นว่าแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดสามารถสร้างกรดโดโมอิกและเป็นไปได้ที่กรดโดโมอิกจากแพลงก์ตอนพืชจะเป็นแหล่งของพิษที่สะสมในหอย เนื่องจากปริมาณกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชและในหอยมีค่าสูงในเดือนพฤษภาคมสอดคล้องกัน ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการบริโภคหอยนางรมหนามในเดือนพฤษภาคม อย่างไรก็ตามปริมาณกรดโดโมอิกที่พบมีค่าต่ำกว่าระดับที่เป็นอันตราย คือ 20 ไมโครกรัม/กรัม

ภาควิชา......วิทยาศาสตร์ทางทะเล..ลายมือชื่อนิสิต..........ทิพวรรณ ยอดยิ่ง..........
สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์ทางทะเล..ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..........
ปีการศึกษา..2552......................ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..........

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4972309823: MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: domoic acid / spiny oyster / *Spondylus* cf. *versicolor*.

TIPPAWAN YOTYING: SEASONAL VARIATIONS OF DOMOIC ACID ACCUMULATION IN SPINY OYSTER *Spondylus* cf. *versicolor* AT KHAM YAI ISLAND CHONBURI PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. THAITHAWORN LIRDWITAYAPRASIT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D., 116 pp.

Domoic acid is the causative agent of amnesic shellfish poisoning (ASP). Some diatoms such as *Pseudo-nitzschia* spp. and *Nitzschia* spp. are known as the toxin producers. Domoic acid will be accumulated in bivalves that feed on those toxic species and able to be transferred through the food chain which may intoxicate to animals in higher trophic level such as human. In this study, changes of domoic acid accumulated in *Spondylus* cf. *versicolor* and in phytoplankton collected during southwest monsoon season and northeast monsoon season at Kham Yai Island, Chonburi Province were examined by the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. The highest domoic acids content in *S.* cf. *versicolor* was found in May with highest domoic acids accumulated in digestive gland. The highest domoic acids content in phytoplankton was also found in May. At below 0.5 m. sea surface station 1, the domoic acids content in phytoplankton was 1.01 ± 0.03 and 0.54 ± 0.02 ng/L for phytoplankton of which size was larger than 20 μm and less than 20 μm, respectively. At 0.5 m. over sea bottom station 1, the domoic acids content in phytoplankton was 0.80 ± 0.09 and 0.86 ± 0.03 ng/L for phytoplankton of which size was larger than 20 μm and less than 20 μm, respectively. At below 0.5 m. sea surface station 2, the domoic acids content in phytoplankton was 0.96 ± 0.01 and 1.20 ± 0.08 ng/L for phytoplankton of which size was larger than 20 μm and less than 20 μm, respectively. At 0.5 m. over sea bottom station 2, the domoic acids content in phytoplankton was 0.98 ± 0.03 and 0.93 ± 0.03 ng/L for phytoplankton of which size was larger than 20 μm and less than 20 μm, respectively. The results for HPLC analysis of domoic acid not were detected. The results suggested that two size of phytoplankton could produce domoic acids, therefore phytoplankton might be a source of toxin that be able to accumulate in the *S.* cf. *versicolor* because of high domoic acids content in phytoplankton is consistent with *S.* cf. *versicolor* in May. Thus consumption should avoid eating Spiny Oyster in May. However, domoic acid was found lower than regulation level of 20 μg/g.

Depertment...... : Marine Science.....Student's Signature.......ทิพวรรณ ยอดยิ่ง.......

Field of Study.... : Marine Science.....Advisor's Signature..........................

Academic Year.. : 2009.................Co-Advisor's Signature..........................

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ ให้ความรู้ชี้แนะแนวทางในการทำงานวิจัย และตรวจสอบแก้ไขข้อผิดพลาดในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ที่ให้ความรู้และคำแนะนำ และด้านงบประมาณในการทำงานวิจัยจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา วัฒยากร รองศาสตราจารย์ ดร.เชษฐพงษ์ เมฆสัมพันธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิติธรรมยงที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำในการแก้ไข้ข้อผิดพลาดในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบรูณ์มากขึ้น

ขอบพระคุณ Prof. Dr. Massaki Kodama ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือเรื่องสารเคมี วัสดุอุปกรณ์ต่างๆในการทำงานวิจัย

ขอบคุณ คุณอิงอร ทองคำดี คุณ อิทธิพร ตัณกุลวณิชย์ ที่ช่วยเก็บตัวอย่างและให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย และขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ และอบรมสั่งสอน ขอบคุณ พ่อ แม่ พี่น้องและเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย........	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ........	จ
กิตติกรรมประกาศ........	ฉ
สารบัญ........	ช
สารบัญตาราง........	ฌ
สารบัญรูป........	ญ
บทที่	
1 บทนำ........	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา........	1
1.2 วัตถุประสงค์........	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ........	2
2 การสำรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง........	3
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของหอยนางรมหนาม........	3
2.2 ลักษณะทางชีววิทยาของแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp	4
2.4 พิษและความเป็นพิษของ Amnesic shellfish poisoning (ASP)........	7
2.5 การเกิดพิษ ASP ในต่างประเทศ และประเทศไทย........	12
2.7 พิษ ASP ในแพลงก์ตอนพืชที่เลี้ยง........	22
2.8 การทำงานของ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)........	24
2.9 โครมาโทกราฟีเหลว (liquid chromatography)........	28
3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการศึกษา........	36
3.1 พื้นที่ศึกษา........	36
3.2 ระยะเวลาในการศึกษา........	37
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินการศึกษา........	37
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ........	45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

4 ผลการศึกษา…………………………………………………………………………….. 46

4.1 การศึกษาปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยง ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA………………………………………………………………………… 46

4.2 การวิเคราะห์กรดโดโมอิกในสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยงด้วย HPLC………………………………………………………………………… 60

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล……………………… 62

5 อภิปรายผลการศึกษา………………………………………………………………... 64

6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ…………………………………………………… 70

รายการอ้างอิง………………………………………………………………………...... 72

ภาคผนวก………………………………………………………………………………….. 79

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์………………………………………………………………… 116

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การละลายของกรดโดโมอิกในตัวทำละลายชนิดต่างกัน..............................	9
2.2	สูตรโครงสร้างกรดโดโมอิกและอนุพันธุ์ของกรดโดโมอิก..............................	10
2.3	พิษของกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช และการกระจายในประเทศต่างๆ..........	14
2.4	พิษของกรดโดโมอิกในสัตว์น้ำ และการกระจายในประเทศต่างๆ...................	17
2.5	แพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง ที่สามารถผลิตกรดโดโมอิกได้....................	23
2.6	โครมาโทกราฟีเหลว (liquid chromatography) แบ่งตามชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ และวัฏภาคนิ่ง..	29
2.7	HPLC ที่ใช้ระบบแตกต่างกัน เพื่อการหาปริมาณกรดโดโมอิก.......................	33
2.8	วิธีการสกัด และเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง เพื่อการหาปริมาณกรดโดโมอิก.......	34
2.9	วิธีการตรวจหากรดโดโมอิก และค่าต่ำสุดของแต่ละวิธีที่สามารถตรวจหากรดโดโอิกพบในสัตว์น้ำ..	35
4.1	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะหอยนางรมหนาม *s.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนที่กรองแยกจากน้ำทะเล บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี ที่ระดับนัยสำคัญ 95 %..	62
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะหอยนางรมหนาม *s.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนที่กรองแยกจากน้ำทะเล บริเวณสถานี 2 ที่ระดับนัยสำคัญ 95 %..	63
5.1	ปริมาณกรดโดโมอิกที่พบในอวัยวะส่วนต่างๆ ของหอยสองฝา.....................	65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะฝา และส่วนต่างๆของ *Pseudo-nitzschia fraudulenta* บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน... 6

2.2 ลักษณะสายของเซลล์ *Pseudo-nitzschia* spp. (A) คือ ด้าน girdle (B) คือ ด้าน valve และ (C) คือ คลอโรพลาสต์.. 6

2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของกรดโดโมอิกบริเวณสมอง hippocampus.................... 11

2.4 โครมาโทแกรมของสารที่แยกได้ดี.. 30

2.5 แผนผังของเครื่องโครมาโทกราฟีอย่างง่าย (1) ขวดบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ (2) เครื่องสูบ (3) ส่วนวัดความดัน (4) ท่อกรอง (5) pulse damper (6) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (7) เครื่องฉีดตัวอย่าง (8) คอลัมน์โครมาโทกราฟี (9) เครื่องตรวจวัด (10) เครื่องบันทึกผล (11) เครื่องจัดการข้อมูล 31

3.1 พื้นที่ศึกษาเกาะขามใหญ่ ตำบลท่าเทววงษ์ อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี........ 36

3.2 วิธีการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากน้ำทะเล บริเวณ เกาะขามใหญ่ จังหวั ชลบุรี.. 38

3.3 หอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* บริเวณ เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี......... 38

3.4 เครื่อง Rotary Vacuum Evaporator อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส.................. 40

3.5 เครื่อง micro plate reader วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร... 42

3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของกรดโดโมอิก...... 43

3.7 สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นกรดโดโมอิกมาตรฐาน.. 43

3.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่พีกของกรดโดโมอิกที่ความยาวคลื่นคงที่ 242 นาโนเมตร กับความเข้มข้นกรดโดโมอิกมาตรฐาน.................................. 44

4.1 กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล บริเวณสถานี 1... 46

4.2 กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 1... 47

4.3 กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล บริเวณสถานี 2... 48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่		หน้า
4.4	กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 2........	49
4.5	ค่าเฉลี่ยกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 และสถานี 2	50
4.6	กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ adductor muscle ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ 2551 และ พฤษภาคม 2552 บริเวณสถานี 1 และสถานี 2	51
4.7	กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ gonad ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ 2551 และ พฤษภาคม 2552 บริเวณสถานี 1 และสถานี 2	52
4.8	กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ digestive gland ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ 2551 และ พฤษภาคม 2552 บริเวณสถานี 1 และสถานี 2	53
4.9	ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนพฤษภาคม clone May-2 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร บริเวณสถานี 2	55
4.10	ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp. ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนกันยายน clone Sep-1 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 2	56
4.11	ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนกันยายน clone Sep-2 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล บริเวณสถานี 1........	57
4.12	ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp. ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนธันวาคม clone Decem-1 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 1........	58
4.13	ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนกุมภาพันธ์ clone Feb-5 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 2........	59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ หน้า
4.14 ปริมาณกรดโดโมอิกของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 และสถานี 2…………………… 59
4.15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดโดโมอิกความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร……………………………………………………………………………… 60
4.16 โครมาโทแกรมของกรดโดโมอิกในสารละลายตัวอย่างที่สกัดจากแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมสกุล *Nitzschia* จากตัวอย่างเลี้ยง ในเดือนสิงหาคม ปี 2550 บริเวณป้อมพระจุล จังหวัดสมุทรปราการ……………………………………………………… 61
4.17 ลักษณะเซลล์แพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมสกุล *Nitzschia* ที่สามารถสร้างกรดโดโมอิกที่แยกได้จาก บริเวณป้อมพระจุล จังหวัดสมุทรปราการ………………... 61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แพลงก์ตอนพืช มีความสำคัญในฐานะเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นของห่วงโซ่อาหารในทะเล อย่างไรก็ตาม Sournia (1995) รายงานว่าแพลงก์ตอนพืชในโลกมีประมาณ 4,000 ชนิด ที่สามารถสร้างสารชีวพิษ (biotoxin) ได้มีประมาณ 80 ชนิด โดยพิษจากแพลงก์ตอนพืชจะเข้าไปสะสมอยู่ในร่างกายของสัตว์น้ำที่กรองกินแพลงก์ตอนพืชที่มีพิษนั้นเป็นอาหาร ทั้งนี้จะไม่ส่งผลกระทบต่อสัตวน้ำที่เป็นผู้บริโภคอันดับหนึ่ง แต่อาจถ่ายทอดความเป็นพิษผ่านห่วงโซ่อาหารตามลำดับการบริโภสู่ผู้บริโภคในลำดับสูงถึงมนุษย์ เช่น กรดโดโมอิก ที่เป็นสาเหตุของ amnesic shellfish poisoning (ASP) ที่พบได้ในแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอม เช่น *Pseudo-nitzschia* spp. *Nitzschia* spp. เป็นต้น พิษของ กรดโดโมอิก พบครั้งแรกในปี 1958 โดยการแยกจากสาหร่ายทะเลสีแดงชนิด *Chondria armata* (Quilliam et al., 1989) จากนั้นการศึกษาความเป็นพิษนี้เริ่มอย่างจริงจังในปี ค.ศ 1987 ที่ Prince Edward Island ประเทศแคนนาดา เมื่อเกิดการสะพรั่งของแพลงก์ตอนพืชชนิด *Pseudo-nitzschia multiseries* (Lundholm and Moestrup, 2000) ทำให้ประชาชนผู้บริโภคหอยแมลงภู่ในบริเวณดังกล่าวแสดงอาการของ ASP มีผู้ป่วย 150 คน และมีผู้เสียชีวิต 4 คน จากการตรวจวิเคราะห์พิษพบว่า *P. multiseries* สามารถผลิตกรดโดโมอิก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิด ASP ขึ้น โดยพิษจะสะสมในหอยแมลงภู่ที่กรองกินแพลงก์ตอนพืชชนิดนี้

สำหรับความเป็นพิษในหอยที่ประเทศไทยมีรายงานความเป็นพิษชนิด อัมพาตในหอย (Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) ที่ปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เมื่อปี 2526 แต่ไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดว่าเกิดขึ้นเนื่องจากแพลงก์ตอนพืชชนิดใด หลังจากนั้นก็ไม่มีรายงานความเป็นพิษในหอยอีก อย่างไรก็ตามการศึกษาของ รวมทรัพย์ ชำนาญธนา (2549) พบแพลงก์ตอนพืชชนิด *Pseudo-nitzschia* spp. กระจายอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนใน จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี และพบปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีจากแพลงก์ตอนพืชกลุ่ม *Pseudo-nitzschia* spp. บริเวณชายฝั่งทะเลบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร (รวมทรัพย์ ชำนาญธนา, 2547) นอกจากนี้ ชลธยา ทรงรูป (2546) ได้รายงานการกระจายของ *Pseudo-nitzschia* spp. บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือน มกราคม ถึง เดือนธันวาคม 2533 และพบแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp. บริเวณชายฝั่งมาบตาพุด (ประยูร สุรตระกูล, 2533 อ้างถึงใน สมภพ รุ่งสุภา และ

คณะ, 2546) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าจะพบ *Pseudo-nitzschia* spp. กระจายอยู่ทั่วไปในอ่าวไทยตอนใน

แม้ว่าการศึกษากรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชในสกุล *Pseudo-nitzschia* และ *Nitzschia* ในประเทศไทยยังไม่เคยมีผู้ศึกษา แต่การตรวจพบแพลงก์ตอนสกุลดังกล่าวกระจายอยู่ทั่วไปในอ่าวไทยตอนใน แสดงให้เห็นว่า พื้นที่นี้มีความเสี่ยงที่หอยสองฝาจะปนเปื้อนพิษ ASP ได้ และจากการศึกษาของ Takata et al. (2009) พบว่าหอยนางรมหนามชนิด *Spondylus* cf. *versicolor* ที่เก็บจากแสมสาร (ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี) มีการสะสมกรดโดโมอิกได้เช่นกัน นอกจากนี้หอยชนิดนี้เป็นที่นิยมบริโภคในจังหวัดชายทะเลที่มีแนวปะการัง ดังนั้นจึงสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลของการสะสมกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืชที่สามารถผลิตกรดโดโมอิก บริเวณเกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลของการสะสมกรดโดโมอิก ในอวัยวะส่วนต่างๆ ของหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* และในแพลงก์ตอนพืช

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการเตือนภัยและช่วยจัดการเรื่องความปลอดภัยในการบริโภคอาหารทะเล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของหอยนางรมหนาม

หอยนางรมหนามมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spondylus versicolor* Schreibers, 1793 และมีชื่อสามัญว่า Spiny Oyster โดยมีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Mollusca

Class Bivalvia

Subclass Pteriomorphia

Order Pterioida

Suborder Pteriina

Family Spondylidae

Genus *Spondylus*

Species *Spondylus versicolor*

(Schreibers, cited in Lamprell and Healy, 1998)

หอยนางรมหนามเป็นหอยสองฝา ลักษณะของเปลือกรูปไข่พอสมควร ความโค้งนูนไม่เท่ากัน ความสูงของเปลือกประมาณ 65 มิลลิเมตร มีลักษณะสั้น ที่ปลายเปลือกเป็นแนวรัศมีรูปร่างบาง หนามตั้งตรง ร่องมีลักษณะเรียบ เปลือกมีหลายสี เช่น สีน้ำตาล สีขาว หนามสีส้ม ส้เหลือง หรือ สีขาว ถ้าเป็นสีขาวจะหายาก ภายในเปลือกจะมีสีฟ้าและสีขาว มีสีน้ำตาลที่บริเวณขอบานพับ (hinge) ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการยึดติดบริเวณ umbonal (Lamprell and Healy, 1998) สุเมตต์ ปุจฉาการ และคณะ (2547) พบว่าหอยนางรมหนาม *Spondylus* sp. กระจายอยู่บริเวณหมู่เกาะต่างๆ ได้แก่ หมู่เกาะสีชัง หมู่เกาะล้าน หมู่เกาะไผ่ หมู่เกาะริ้น หมู่เกาะคราม หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี จากการสำรวจพื้นที่พบหอยนางรมหนาม *Spondylus wrightianus* Crosse ที่บริเวณหมู่เกาะไผ่ และหมู่เกาะคราม Dakin (1928) ธรณ์ ธำรงนาวาสวัสดิ์ และ สกลพรรณ ทิพานันท์ (2541) พบว่าหอยนางรมหนาม *Spondylus* sp.จะอาศัยอยู่ตามซอกปะการังก้อน ลักษณะเปลือกมีหนามยาวเป็นลักษณะเด่น กรองกินอาหารที่พัดพามากับกระแสน้ำตอนกลางคืน และจากการศึกษาของ สมบัติ อินทร์คง และ อเนก โสภณ (2548) พบว่าหอยหอยนางรมหนาม หรือ หอยฟันกระต่าย จะอาศัยอยู่ในบริเวณแนวปะการัง ตั้งแต่เขตน้ำตื้นถึงเขตน้ำลึก โดยยึดต

อยู่กับก้อนหินหรือตามซอกหิน เป็นหอยที่มีเนื้อมากนิยมบริโภค แต่ปัจจุบันมีปริมาณลดน้อยลงมาก โดยสามารถพบได้บริเวณเกาะค้างคาว เกาะขามใหญ่ และเกาะท้ายตาหมื่นในต่างประเทศ Lamprell and Healy (1998) พบหอยชนิดนี้กระจายบริเวณทางตอนเหนือของ Queensland จนถึงตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศออสเตรเลีย และจากการศึกษาของ Paulay (1995) พบว่าหอยนางรมหนาม *Spondylus cuneatus* กระจายอยู่บริเวณ Madagascar และ Hawaii หอยนางรมหนาม *Spondylus violascens* พบกระจายอยู่บริเวณประเทศอินโดนีเซีย และ Hawaii

2.2 ลักษณะทางชีววิทยาของแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp.

Phylum Bacillariophyta

Class Bacillariophyceae

Order Bacillariales

Suborder Bacillariineae

Family Bacillariaceae

Genus *Pseudo – nitzschia*

(Hasle and Syvertsen, 1979 อ้างถึงใน ลัดดา วงศ์รัตน์, 2538)

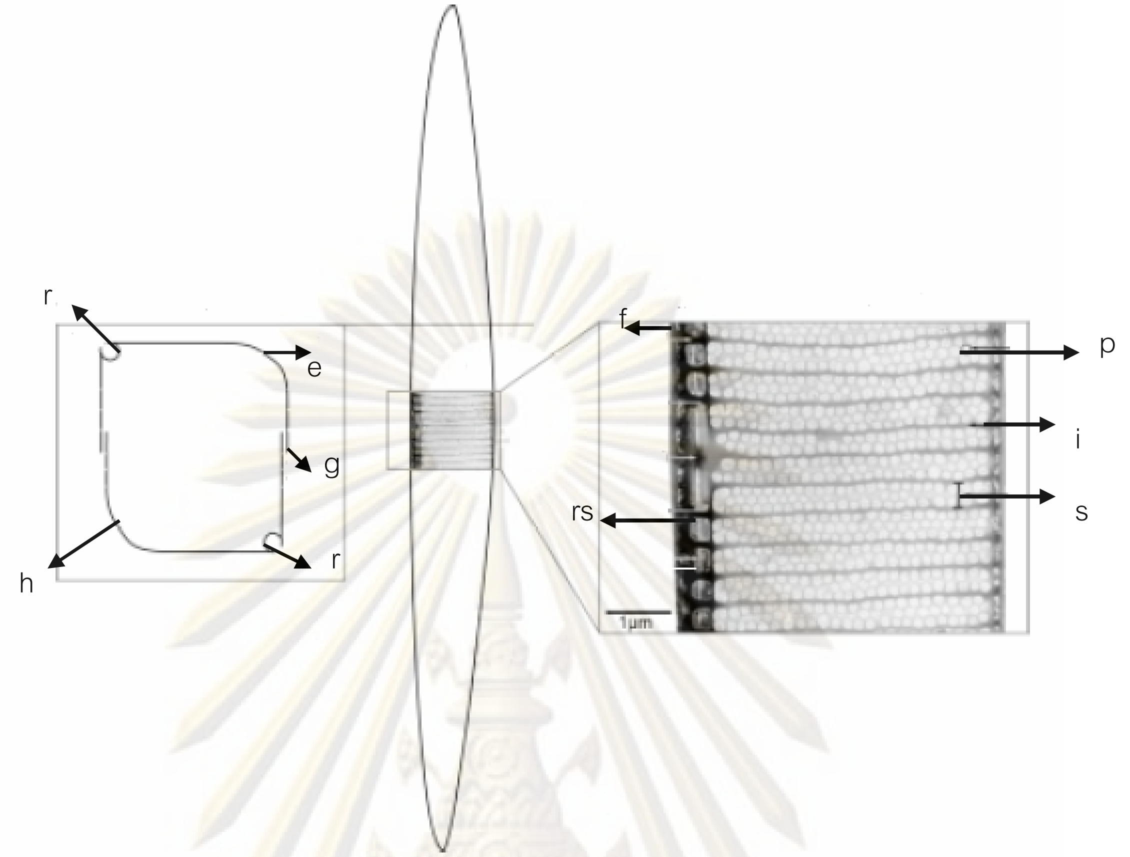
Pseudo - nitzschia spp. เป็นแพลงก์ตอนพืชในกลุ่ม pennate diatom เซลล์ต่อกันเป็นสาย มีลักษณะคล้ายกับขั้นบันได โดยการเชื่อมต่อและวางซ้อนกันของปลายเซลล์ ซึ่งมีความแตกต่างกันในความยาวของส่วนที่ซ้อนกัน *Pseudo-nitzschia* spp. เป็นแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมที่มีสีน้ำตาลแกมทอง มีรงควัตถุ fucoxanthin ประกอบด้วยฝา 2 ฝาประกอบด้วยซิลิกา ฝาจะซ้อนทับกันคล้าย Petri dish เปลือกเซลล์มีรูอยู่รอบๆ จะมีความสำคัญมากในการจำแนกชนิด และการสืบพันธุ์ของไดอะตอมแบบไม่อาศัยเพศเซลล์ลูกแต่ละเซลล์จะได้มาจากเซลล์แม่หนึ่งเซลล์ เช่น เซลล์แม่เป็น epitheca (รูปที่ 2.1) ก็จะได้เซลล์ลูกที่สร้างขึ้นเป็น hypotheca (รูปที่ 2.1) แต่การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของไดอะตอมแต่ละครั้งขนาดของเซลล์จะเล็กลงจากเซลล์เริ่มต้นประมาณ 30% ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในแต่ละครั้งจะได้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และลักษณะโครงสร้างของ *P. multiseries* ที่สามารถผลิตกรดโดโมอิกได้เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope ;TEM) พบผนังเซลล์จะเป็นจุดๆ ประมาณ 13 ถึง15 จุด ที่ 1 ไมโครเมตร เซลล์จะมีรูพรุนระหว่างช่องว่างซี่โครง 3 ถึง 4 แถว มีรูเล็กๆ ประมาณ 5 ถึง 7 รู ขนาดของเซลล์มีความยาว 76.4 ถึง 102.5 ไมโครเมตร และความกว้าง

2.9 ถึง 4.0 ไมโครเมตร (Dizer et al., 2001; Kotaki et al., 1999 ; Mos, 2001;) และลักษณะที่ใช้จำแนกชนิดของสกุล *Pseudo-nitzschia* พิจารณาจากรูปร่างของเซลล์ ความกว้างของเซลล์ จำนวนของช่องว่างระหว่างเส้น (interstriae) : จำนวนฟิบูเล (fibula) (รูปที่ 2.1) ขนาดช่องว่างระหว่างฟิบูเลคู่กลาง (central interspace) รูปร่างของปลายเซลล์ทั้งด้านเกอเดิล ด้านวาล์ว (รูปที่ 2.2) และความยาวที่เหลื่อมกันของเซลล์ติดกัน ไดอะตอมสกุล *Pseudo-nitzschia* เป็นสกุลใหญ่ พบในเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อนมีหลายชนิด (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

ด้านเกอเดิลของเซลล์ *Pseudo – nitzschia australis* เป็นรูปกระสวย เซลล์ต่อกันเป็นสายโดยใช้หน้าฝาแตะกันประมาณ 1/4 ของความยาวอินเตอร์คาลารีแบนด์หนา และมีลายพาดขวาง ลักษณะลายถี่กว่าลายบนฝา ทางด้านวาล์ว (แกนอะพิคัลยาวมากกว่า 100 ไมครอน) หรือเซลล์ขนาดใหญ่จะมีปลายพองออกเล็กน้อย ด้านทั้ง 2 ด้านขนานกันที่บริเวณกึ่งกลางฝา (ยาวประมาณ 1/3 ของความยาวเซลล์) ฟิบูเลเห็นชัดเจนกว่าช่องว่างระหว่างเส้น (interstriae) และจำนวนช่องว่างระหว่างเส้น (interstriae) อยู่ใกล้เคียงกับ fibulae แกนอะพิคัลยาว 75-144 ไมโครเมตร แกนทรานอะพิคัลยาว 6-5-8 ไมโครเมตร จำนวนเส้นและฟิบูเลในระยะ 10 ไมโครเมตร 12-18 แห่ง เป็นชนิดที่พบในเขตร้อนจนถึงเขตอบอุ่น (Hasle and Syvertsen, 1979 อ้างถึงใน ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

ด้านเกอเดิลของเซลล์ *Pseudo – nitzschia pungens* เป็นรูปกระสวย แกนเพอร์วาลวาร์ยาว 8 ไมโครเมตร ปลายของช่องว่างระหว่างฟิบูเลเห็นได้ชัดเจน หน้าฝาของเซลล์ติดกันแตะกันยาวประมาณ 1/3 หรือมากกว่าของความยาวเซลล์ ทางด้านวาล์วเซลล์มีขนาดใหญ่มีปลายเซลล์แหลมมาก (ส่วนเซลล์ขนาดเล็กรูปร่างเซลล์เป็นรูปกระสวย) ผนังเซลล์หนา ช่องว่างระหว่างเส้น (interstriae) เห็นชัดเจน เส้นพาดขวางเซลล์1 เส้น ประกอบด้วยรู (poroids) 2 แถว (biseriate) แกนอะพิคัลยาว 74-142 ไมโครเมตร แกนทรานอะพิคัลยาว 3-4.5 จำนวนเส้นและฟิบูเลในระยะ 10 ไมโครเมตร 9-15 แห่ง เป็นชนิดที่พบในทะเลทั่วโลก (Hasle and Syvertsen, 1979 อ้างถึงใน ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 ลักษณะฝา และส่วนต่างๆของ *Pseudo-nitzschia fraudulenta* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน e = epitheca ; g = girdle ; h = hypotheca ; r = raphe; f = fibula ; i = interstria ; p = poroid ; rs = raphe slit ; s = stria (ที่มา : Fehling, 2004)

รูปที่ 2.2 ลักษณะสายของเซลล์ *Pseudo-nitzschia* spp. (A) คือ ด้าน girdle (B) คือ ด้าน valve และ (C) คือ คลอโรพลาสต์ (ที่มา : Fehling, 2004)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 ลักษณะทางชีววิทยาของแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp.

Phylum Bacillariophyta
Class Bacillariophyceae
Order Bacillariales
Suborder Bacillariineae
Family Bacillariaceae
Genus *Nitzschia*

(Hasle and Syvertsen, 1979 อ้างถึงใน ลัดดา วงศ์รัตน์, 2538)

ลักษณะเซลล์ *Nitzschia* spp. มักอยู่เดี่ยวๆ หรืออาจอยู่กันเป็นเส้นหรือเป็นโคโลนีรูปดาว เซลล์รูปรีเหมือนใบข้าว ปลายเซลล์มักแหลม สันบนเซลล์อยู่กึ่งกลางฝาทั้งสองฝา สันที่อยู่บนฝาบนจะอยู่เยื้องกับสันที่อยู่บนฝาล่าง ราฟีอยู่ในสัน และบนราฟีมีบูเล (fibulae) เรียงกัน ลายบนเซลล์เป็นเส้นพาดขวางเซล์และขนานกัน บริเวณกึ่งกลางเซลล์ในแนวตั้งมักใส เรียกว่า สเตอร์นัม คลอโรพลาสต์เป็นแถบสั้นๆ 2 แถบ อยู่เยื้องกันตรงกลางมีไพรีนอยด์ หรือเป็นเป็นแผ่นกลมจำนวนมาก เป็นไดอะตอมที่มีจำนวนชนิดมาก และพบทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม (Hasle, 1976 อ้างถึงใน ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

ลักษณะเซลล์ *Nitzschia pungens* เซลล์รูปรีแบบใบข้าว ปลายทั้ง 2 ด้านแหลม จำนวนรู (Kell punctae) เท่ากับจำนวนของเส้น (striae) ที่พาดขวางเซลล์จำนวน 11-16 เส้น (ปกติมี 13-14 เส้น) ในระยะ 10 ไมโครเมตร คลอโรพลาสต์มี 2 แผ่น ความยาวเซลล์ 71-162 ไมโครเมตร ความกว้าง 2.3 - 4.8 ไมโครเมตร มีลักษณะคล้าย *Nitzschia seriata* มาก แต่ปลายของเซลล์ของ *N. pungens* แหลมกว่าและเซลล์แคบกว่า แตกต่างจากชนิดต้นแบบคือ มีจำนวนเส้นมากกว่าชนิดต้นแบบมีจำนวน 10 เส้น ในระยะ 10 ไมโครเมตร (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2538)

2.4. พิษและความเป็นพิษของ Amnesic shellfish poisoning (ASP)

กรดโดโมอิกแยกได้เป็นครั้งแรกจากสาหร่ายสีแดงชนิด *Chondria armata* ในปี 1958 ที่ประเทศญี่ปุ่น (Bajarias et al., 2006 ; Kotaki et al.,1999; Madhyastha et al., 1991 ; Mos, 2001) จากนั้นในปี ค.ศ 1987 เกิดพิษต่อระบบประสาท ASP เป็นครั้งแรก ที่ Prince Edward Island ประเทศแคนนาดา เนื่องจากแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมชนิด *P. multiseries* (Jeffery et

al., 2004; Kotaki et al., 1999; Madhyastha et al., 1991; Mos, 2001; Ravn,1995) การศึกษาของ Bates and Trainer (2006) พบว่าแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมสกุล *Pseudo-nitzschia* มี 12 ชนิดที่สามารถสร้างกรดโดโมอิกได้ ได้แก่ *Pseudo-nitzschia australis*, *Pseudo-nitzschia calliantha, Pseudo-nitzschia cuspidate* , *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Pseudo-nitzschia fraudulenta*, *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *P. multiseries*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *Pseudo-nitzschia seriata* และ *Pseudo-nitzschia turgidula*. นอกจากนี้ยังสามารถพบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชกลุ่ม pennate diatom ชนิดอื่นๆ อีก เช่น พบใน *Nitzschia navis-varingica* ที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง ประเทศเวียดนาม ซึ่ง *N. navis-varingica* พบกระจายทั่วไปในเขตน้ำกร่อยตั้งแต่เขตร้อนถึงเขตอบอุ่น (Kotaki et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบกรดโดโมอิกในไดอะตอมชนิด *Amphora coffeaeformis* จากแม่น้ำ Seal อ่าว Cardigan (Kotaki et al., 1999; Madhyastha et al., 1991; Mos, 2001) เป็นต้น

ชนิดของพิษ ASP

พิษของ ASP คือสารเคมีชนิดกรดโดโมอิก (2*S*,3*S*,4*S*) -2-carboxy-4-1-methyl-5(*R*)-carboxyl-l(*Z*)-3(*E*)-hexadienyl pyrrolidine-3-acetic acid ($C_{15}H_{21}NO_6$) เป็น amino toxin ชนิด tricarboxylic amino acid

คุณสมบัติทางเคมีของกรดโดโมอิก เป็นผงใส ไม่มีสี น้ำหนักมวลโมเลกุล 311.14 จุดหลอมเหลว 215 ถึง 216 องศาเซลเซียส (Wright and Quilliam,1995) สามารถละลายน้ำได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และกรดโดโมอิกละลายในแอลกอฮอล์ได้น้อยมาก (Falk et al., 1991) แสดงดังตารางที่ 2.1 และพบว่ากรดโดโมอิกมีประโยชน์ในการรักษาโรคพยาธิในลำไส้ โดยให้ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 20 มิลลิกรัม (Konosu et al., 1979) และมีอนุพันธุ์ของกรดโดโมอิก ได้แก่ อนุพันธุ์กรดโดโมอิก A, อนุพันธุ์กรดโดโมอิก B, อนุพันธุ์กรดโดโมอิก C, อนุพันธุ์กรดโดโมอิก D, อนุพันธุ์กรดโดโมอิก E, อนุพันธุ์กรดโดโมอิก F และอนุพันธุ์กรดโดโมอิก G (Clayden et al., 2005) แสดงดังตารางที่ 2.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

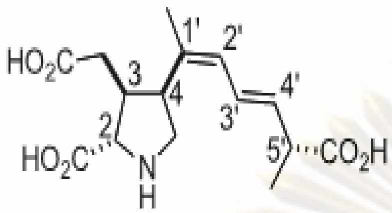
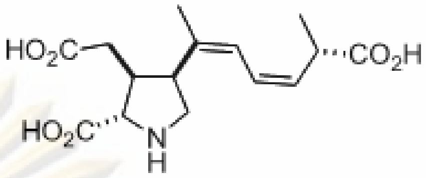
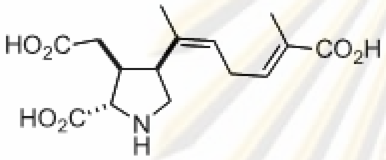
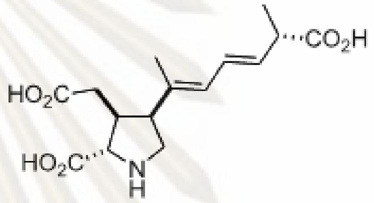
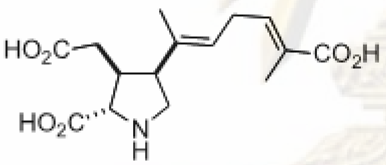
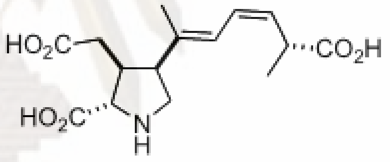
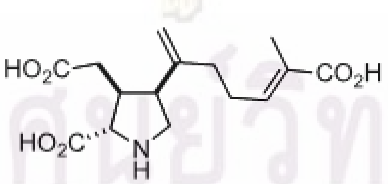
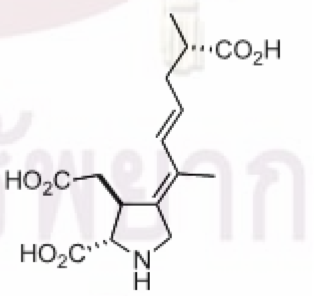
ตารางที่ 2.1 ความสามารถในการละลายของกรดโดโมอิกในตัวทำละลายชนิดต่างกัน

Solvent (method)	Solubility	
	mmol / L	g / L
D_2O	24.3±1.0	7.6
3.5% NaCl in D_2O	25.4 ±1.0	7.9
Methanol	2.1±0.2	0.66
1-Octanol	0.2	0.062
Dichloromethane	0.0076	0.0023
Acetonitrile	0.0037	0.0011
Cyclohexane	< 0.00002	< 0.000006
Water	-	7.6

(ที่มา : Falk et al., 1991)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 สูตรโครงสร้างกรดโดโมอิกและอนุพันธุ์ของกรดโดโมอิก

 กรดโดโมอิก	 อนุพันธุ์กรดโดโมอิก D
 อนุพันธุ์กรดโดโมอิก A	 อนุพันธุ์กรดโดโมอิก E
 อนุพันธุ์กรดโดโมอิก B	 อนุพันธุ์กรดโดโมอิก F
 อนุพันธุ์กรดโดโมอิกC	 อนุพันธุ์กรดโดโมอิก G

(ที่มา : Clayden et al., 2005)

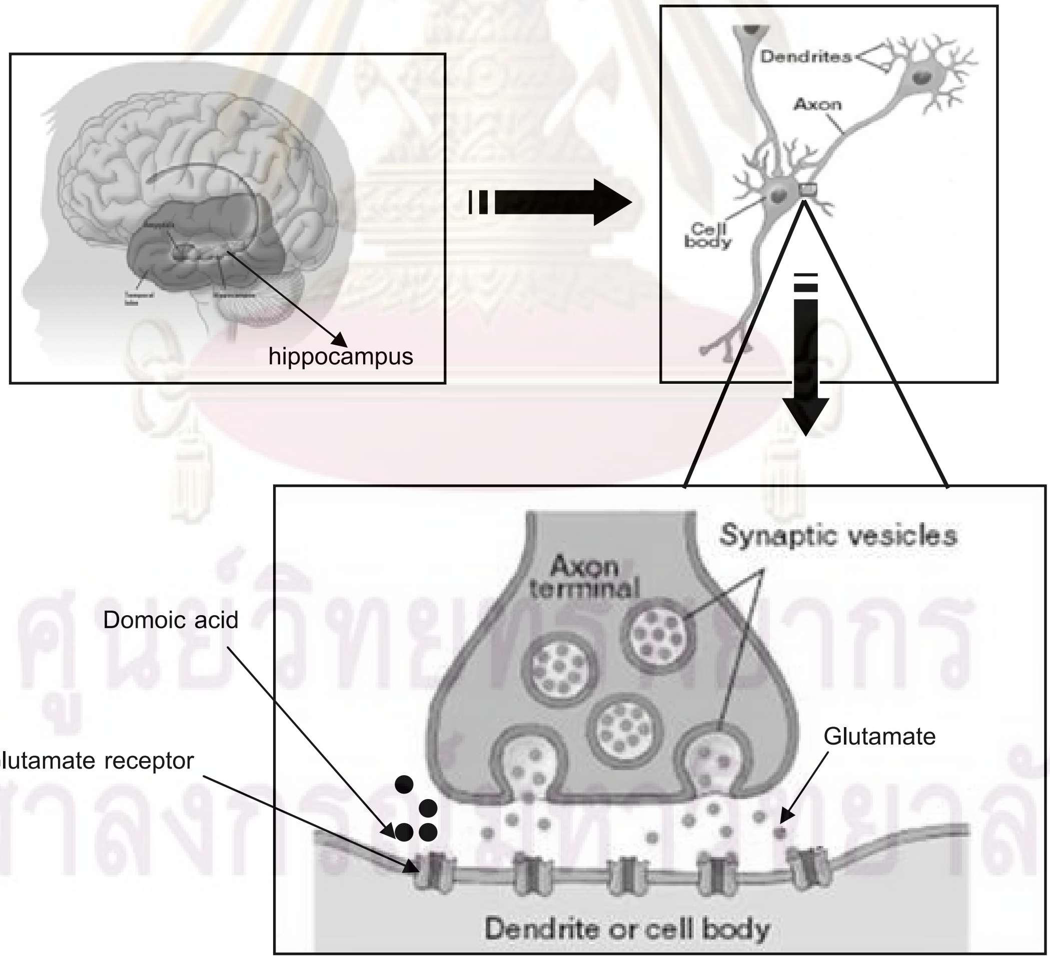
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาการของพิษ ASP ในมนุษย์

การบริโภคหอยที่สะสมพิษ ASP จะมีผลต่อระบบทางเดินอาหารและระบบประสาท โดยจะมีอาการ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มึนงง หมดสติ และทำลายสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่มีหน้าที่ช่วยควบคุมอารมณ์และพฤติกรรม ความทรงจำ ถ้าได้รับพิษเข้าไปในปริมาณมาก จะทำให้สูญเสียความจำระยะสั้นๆ และอาจจะเสียชีวิตได้ (Chan , 2006)

กลไกการออกฤทธิ์ของพิษ ASP

กรดโดโมอิกจะออกฤทธิ์โดยตรงต่อสมองส่วน hippocampus ตรงบริเวณที่เกิดการ synap ของเซลล์ประสาท 2 เซลล์ในสมองส่วน hippocampus พบว่าบริเวณ Synap ในภาวะปกติ glutamate จะจับกับ glutamate receptor แต่เมื่อได้รับกรดโดโมอิกเข้าไปกรดโดโมอิกจะเข้าไปจับกับ glutamate receptor แทนทำให้ช่องโซเดียมไอออนที่ผนังเซลล์เปิดกว้างมาก โซเดียมไอออนที่อยู่ภายนอกเซลล์ไหลทะลักเข้าสู่เซลล์ประสาทในปริมาณมาก ทำให้เซลล์ประสาทบวมและแตก



รูปที่ 2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของกรดโดโมอิกบริเวณสมอง hippocampus (ที่มา: Chan, 2006)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 การเกิดพิษ ASP ในต่างประเทศ

การสะพรั่งของ *P. multiseries* บริเวณ Prince Edward Island ประเทศแคนนาดา ทำให้ผู้บริโภคหอยแมลงภู่ในบริเวณดังกล่าว เกิดพิษต่อระบบประสาท ASP เป็นครั้งแรก และส่งผลให้คนไข้ 13 ราย มีอาการหมดสติ คนไข้ประมาณ 150 คนมีปัญหาเรื่องระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ อาเจียน 76% ปอดท้อง 50% ท้องร่วง 42% และคนไข้ 14 รายมีอาการสาหัสมาก (Jeffery et al., 2004; Kotaki et al., 1999; Madhyastha et al., 1991; Mos, 2001; Ravn,1995)

แพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. พบหนาแน่นมากในบริเวณชายฝั่ง Skagerrak ของประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1991 ส่งผลให้นก pelican ที่กินปลาในบริเวณดังกล่าวตาย (Mos, 2001) นอกจากนี้บริเวณด้านตะวันตกของชายฝั่งสหรัฐอเมริกา ได้แก่ California, Oregon, Washington เกิดปรากฏการณ์ upwelling ส่งผลให้มีแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. เพิ่มจำนวนมาก (Kotaki et al., 1999; Madhyastha et al., 1991; Mos,2001) และพบว่าประชาชนในเมือง Washington ที่บริโภคหอยหลอด (razor clams) ที่มีกรดโดโมอิกสะสมอยู่ทำให้มีคนป่วย มีอาการเกี่ยวกับทางเดินอาหาร และหลังจากนั้นจะมีอาการเกี่ยวกับระบบประสาท (Jeffery et al., 2004)

การศึกษาของ Kotaki et al. (1999) บริเวณอ่าว Ofunato ประเทศญี่ปุ่น พบแพลงก์ตอนพืช *P. multiseries* ผลิตกรดโดโมอิกสูงมาก ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม โดยพบ *Pseudo-nitzschia* spp. 44 สายพันธุ์ และมี 1 สายพันธุ์เป็นพิษคือ *P. multiseries*

การศึกษาของ Bajarias et al. (2006) บริเวณอ่าว Manila ประเทศฟิลิปปินส์ พบ *Pseudo – nitzschia* spp. 21,000 ถึง 42,000 cell/L ในเดือนมิถุนายน โดยบริเวณ Bulacan Estuary ในอ่าว Manila พบ *N. navis-varingica* ที่สามารถผลิตกรดโดโมอิก, อนุพันธ์กรดโดโมอิก A และ อนุพันธ์กรดโดโมอิก B และที่บริเวณ Iba estuary พบ *Nitzschia* sp.18 สายพันธุ์ มีประมาณ 5 สายพันธุ์ สามารถผลิตอนุพันธ์กรดโดโมอิก A ได้ประมาณ 0.3 - 4.0 pg/cell (เฉลี่ย 2.1 pg/cell) และผลิตอนุพันธ์กรดโดโมอิก B ได้ 0.1 - 5.5 pg/cell (เฉลี่ย 2.2 pg/cell) แต่ไม่ผลิตกรดโดโมอิก จากการศึกษาของ Kotaki et al. (2005) บริเวณอ่าว San Pedro อ่าว Tacloban City และอ่าว Manila พบไดอะตอม *Nitzschia* spp. ที่สามารถผลิตกรดโดโมอิกได้ประมาณ 1.3 - 5.6 pg/cell

สำหรับประเทศเวียดนาม Ha et al. (2006) ตรวจพบกรดโดโมอิกใน *N. navis-varingica* บริเวณ Do Son เมือง Hai Phong และพบ *Pseudo-nitzschia* spp. โดยในเดือนมกราคม ปี 2003 ที่บริเวณ Cat Ba พบ *Pseudo-nitzschia* spp. ประมาณ 928,650 cell/L ที่บริเวณ Do Son พบ *Pseudo-nitzschia* spp. ประมาณ 8,697,000 cell/L (Kotaki et al., 2000 อ้างถึงใน Huyen

et al., 2006) นอกจากนี้การศึกษาของ Takata et al. (2003) อ้างถึงใน Ha et al. (2004) พบว่าในเดือนมีนาคม 2004 ตรวจพบกรดโดโมอิก 12.26 ไมโครกรัม/กรัม ด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) ในหอยนางรมหนาม *Spondylus squamosus* ที่บริเวณ Nha Phu lagoon เขต Khanh Hoa ซึ่ง Ha et al. (2006) พบว่าปี 2004 เดือนธันวาคมหอยนางรมหนาม *Spondylus cruentus* มีปริมาณกรดโดโมอิก 1.6 µg/g ปี 2005 เดือนมีนาคม มีปริมาณกรดโดโมอิกสูงสุด 2.2 µg/g และเดือนกุมภาพันธุ์ เมษายน พฤษภาคม มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม มีปริมาณกรดโดโมอิกต่ำสุด 1 µg/g

ปัจจุบันมีการค้นพบกรดโดโมอิกในหอยสองฝาสกุล *Spondylus* ซึ่งสุ่มเก็บหลายพื้นที่ในเขตร้อน ได้แก่ ประเทศไทย เวียดนาม ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และไม่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในหอยสองฝาชนิดอื่นที่อยู่พื้นที่เดียวกันกับหอยนางรมหนาม *Spondylus* spp. (Takata et al., 2009) การศึกษาของกรดโดโมอิกในประเทศอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 2.3 และ 2.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 พิษของกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช และการกระจายในประเทศต่างๆ

ปี	สถานที่	เหตุการณ์	ปริมาณพิษ	ที่มา
1991	Gulf of Mexico ประเทศเม็กซิโก	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia pungens multiseries*	แพลงก์ตอนพืช *N. pungens multiseries* 2.1 พิโกกรัม/เซลล์	Dickey et al., 1992
1992	Amurskii Bay ประเทศญี่ปุ่น	พบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia pungens* และ *P. multiseries*	แพลงก์ตอนพืช *P. pungens* 11×10^{6} เซลล์/ลิตร	Stonik et al., 2001
1994-1995	Ofunato Bay ประเทศญี่ปุ่น	พบแพลงก์ตอนพืช *P. multiseries*	*	Kotaki et al., 1999
1997	Amurskii Bay ประเทศญี่ปุ่น	พบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*	แพลงก์ตอนพืช *P. pseudodelicatissima* 2.7×10^{6} เซลล์/ลิตร	Stonik et al., 2001
1998	California coastal upwelling zone ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *P. australis* และ *P. multiseries*	แพลงก์ตอนพืช *P. australis* 78 พิโกกรัม/เซลล์ และ *P. multiseries* 6 พิโกกรัม/เซลล์	Trainer et al., 2000
1999	ทะเลแอตแลนติก และทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศฝรั่งเศส	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *P. pseudodelicatissima* และ *P. multiseries*	*	Amzil et al., 2001

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14

ตารางที่ 2.3 พิษของกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช และการกระจายในประเทศต่างๆ (ต่อ)

ปี	สถานที่	เหตุการณ์	ปริมาณพิษ	ที่มา
1999-2000	Monterey Bay ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp.	แพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp.3.2 x 10^3– 5 x 10^5 เซลล์/ลิตร	Lefebvre et al., 2002
1999-2000	Ishhigaki Island, Tohoku district, Sakari Estuary ประเทศญี่ปุ่น	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *N. naris-varingica*	แพลงก์ตอนพืช *N. naris-varingica* ที่ Ishhigaki Island 0.7 พิโกกรัม/เซลล์,Tohoku district 3.0 พิโกกรัม/เซลล์ และ Sakari Estuary 2.1 พิโกกรัม/เซลล์	Kotaki et al., 2004
1999-2000	Bacoor Estuary ประเทศฟิลิปปินส์	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *N. naris-varingica*	แพลงก์ตอนพืช *N. naris-varingica* 5.6 พิโกกรัม/เซลล์	Kotaki et al., 2004
2000	Monterey Bay, ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *P. australis*	*	Bargu et al., 2008
2000	Monterey Bay,California ประเทศประเทศสหรัฐอเมริกา	พบแพลงก์ตอนพืช *P. australis*	*	Goldberg , 2003
2002-2003	Monterey Bay, California, ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp.	*	Vigilant and May, 2007

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 พิษของกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช และการกระจายในประเทศต่างๆ (ต่อ)

ปี	สถานที่	เหตุการณ์	ปริมาณพิษ	ที่มา
2003	San Pedro Bay,Manila Bay ประเทศฟิลิปปินส์	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *N. naris-varingica*	แพลงก์ตอนพืช *N. naris-varingica* 2.5-3.8 พิโกกรัม/เซลล์	Kotaki et al., 2005
2004	San Diego, California ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *P. australis* , *P. multiseries*	แพลงก์ตอนพืช *P. australis* 0.58 ไมโครกรัม/ลิตร	Busse et al., 2006
2005	Manila Bay ประเทศ ฟิลิปปินส์	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. และ *N. naris-varingica*	แพลงก์ตอนพืช *N. naris-varingica* พบ Isodomoic acid A เฉลี่ย 2.1 พิโกกรัม/เซลล์ และ Isodomoic acid B เฉลี่ย 2.2 พิโกกรัม/เซลล์	Bajarias et al., 2006
2005	Nha Phu Bay ประเทศเวียดนาม	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล	แพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล 12 นาโนกรัม/ลิตร	Ha et al., 2009
2007	กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย	พบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช *N. navis-varingica*	แพลงก์ตอนพืช *N. navis-varingica* พบ Isodomoic acid B และกรดโดโมอิกเฉลี่ย 2.1 พิโกกรัม/เซลล์	Romero et al., 2008

หมายเหตุ : * ไม่พบการรายงานปริมาณพิษ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 พิษของกรดโดโมอิกในสัตว์น้ำ และการกระจายในประเทศต่างๆ

ปี	สถานที่	เหตุการณ์	ปริมาณพิษ	ที่มา
1991	Monterey Bay ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบนกทะเล Pelican และ Cormorants ตายมากกว่า 100 ตัว	*	Busse et al., 2006
1992	California ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในอวัยวะภายในของ Dungeness crabs	*	Wright and Quilliam,1995
1994-1995	Ofunato Bay ประเทศญี่ปุ่น	พบกรดโดโมอิกในหอยแมลงภู่ และหอยเชลล์	หอยแมลงภู่ 2.8 ไมโครกรัม/กรัม และหอยเชลล์ 0.8 ไมโครกรัม/กรัม	Kotaki et al., 1999
1998	Monterey Bay ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบสิงโตทะเล *Zalophuscali fornianus* ตาย 100 ตัว	*	Busse et al., 2006
1998	California ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบสิงโตทะเล *Z. fornianus* ตาย 70 ตัว	*	Trainer et al., 2000
1999	ชายฝั่งทะเล ประเทศไอร์แลนด์	พบกรดโดโมอิกในหอย Mussels (*Mytilus edulis*), Scallops(*Pacten maximus*), Oysters (*Crassostrea edulis*)	หอย Mussels (*Mytilus edulis*) น้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/กรัม, Scallops (*Pacten maximus*) 240 ไมโครกรัม/กรัม, Oysters (*Crassostrea edulis*) น้อยกว่า 5.0 ไมโครกรัม/กรัม	James et al., 2005

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17

ตารางที่ 2.4 พิษของกรดโดโมอิกในสัตว์น้ำ และการกระจายในประเทศต่างๆ (ต่อ)

ปี	สถานที่	เหตุการณ์	ปริมาณพิษ	ที่มา
1999	ทะเลแอตแลนติก และทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศฝรั่งเศส	พบกรดโดโมอิกในหอย *Donax trunculus*, หอย *Mytilus edulis gllloprovincialis* และหอย *Ruditapes decussates*	หอย *D. trunculus* 3.2 ไมโครกรัม/กรัม หอย *M. edulis* 2.6 ไมโครกรัม/กรัม และหอย *R. decussates* 1.55 ไมโครกรัม/กรัม	Amzil et al., 2001
1999-2000	Monterey Bay ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในปลา anchovy และปลา sardine	ปลา anchovy 1,815 ไมโครกรัม/กรัม และปลา sardine 728 ไมโครกรัม/กรัม	Lefebvre et al., 2002
2000	Monterey Bay, ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกใน squid (*Loligo opalescens*)	squid (*L. opalescens*) น้อยกว่า 0.3 ไมโครกรัม/กรัม	Bargu et al., 2008
2000	Monterey Bay,California ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในสัตว์หน้าดิน *Nassarius fossatus*, *Emerita analoga*, *Citharicthys sordidus*, *Callianassa californiensis*, *Pagurus samuelis*, *Dendraster excentricus*, และ *Olivella biplicata*	สัตว์หน้าดิน *N. fossatus* 673 ppm, *E. analoga* 278 ppm, *C. sordidus* 514 ppm, *C. californiensis* 144 ppm, *P. samuelis* 55 ppm, *D. excentricus* 13 ppm และ *O. biplicata* 2 ppm,	Goldberg , 2003
2002	San Diego ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในปู *Pleuroncodes planipes*	ปู *P. planipes* 374 ไมโครกรัม/กรัม	Busse et al., 2006

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 พิษของกรดโดโมอิกในสัตว์น้ำ และการกระจายในประเทศต่างๆ (ต่อ)

ปี	**สถานที่**	**เหตุการณ์**	**ปริมาณพิษ**	**ที่มา**
2002-2003	Monterey Bay, California, ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกใน Curlfin turbot (*Pleuronicthys decurrens*)	พบกรดโดโมอิกใน Curlfin turbot (*P. decurrens*) 3 -26 ไมโครกรัม/กรัม	Vigilant and Mary, 2007
2003	Nha Pha lagoon, Khanh Hoa Province ประเทศเวียดนาม	พบกรดโดโมอิกในหอยสองฝา *Spondylus squamosus*	หอยสองฝา *S. squamosus* 12.26 ไมโครกรัม/กรัม	Ha et al., 2004
2004	San Diego, California ประเทศสหรัฐอเมริกา	พบกรดโดโมอิกในหอยแมลงภู่	หอยแมลงภู่ 5.8 ไมโครกรัม/กรัม	Busse et al., 2006
2006	Masinloc Bay, Luzon Island ประเทศฟิลิปปินส์	พบกรดโดโมอิกในหอย *S. squamosus, Perna viridis, Anadara qntiquata, Chama iostoma, Atri vexillum, Placura sella,* และ *Hyotissa hyotis*	พบกรดโดโมอิกในหอย *S. squamosus* 34.42 ไมโครกรัม/กรัม, *Perna viridis* 0.19 ไมโครกรัม/กรัม, *Anadara qntiquata* 0.12 ไมโครกรัม/กรัม, *Chama iostoma* 0.51 ไมโครกรัม/กรัม , *Atria vexillum* 1.73 ไมโครกรัม/กรัม, *Placura sella* 3.17 ไมโครกรัม/กรัม, *Hyotissa hyotis* 0.08 ไมโครกรัม/กรัม	Takata et al., 2009

19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 พิษของกรดโดโมอิกในสัตว์น้ำ และการกระจายในประเทศต่างๆ (ต่อ)

ปี	**สถานที่**	**เหตุการณ์**	**ปริมาณพิษ**	**ที่มา**
2006	Nha Phu Bay ประเทศเวียดนาม	พบกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *S. versicolor*	หอยนางรมหนาม *S. versicolor* 23.88 ไมโครกรัม/กรัม	Takata et al., 2009
2006	Ishigaki Island ประเทศญี่ปุ่น	พบกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *Spondylus sinensis*	หอยนางรมหนาม *S. sinensis* 0.67 ไมโครกรัม/กรัม	Takata et al., 2009
2006	เกาะค้างคาว ประเทศไทย	พบกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *S. versicolor*	หอยนางรมหนาม *S. versicolor* 1.75 ไมโครกรัม/กรัม	Takata et al., 2009

หมายเหตุ : * ไม่พบการรายงานปริมาณพิษ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

20

2.6 การเกิดพิษ ASP ในประเทศไทย

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการเกิดพิษ ASP ในประเทศไทย แต่มีรายงานการกระจายของแพลงก์ตอนพืชที่สามารถสร้างกรดโดโมอิก เช่น การศึกษาแพลงก์ตอนพืชที่เป็นสาเหตุของน้ำทะเเปลี่ยนสีโดย รวมทรัพย์ ชำนาญธนา, (2549) พบว่า *Pseudo-nitzschia* spp. กระจายอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนใน จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี และพบว่าที่บริเวณปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ในเดือนมกราคม 2547 พฤษภาคม 2547 และสิงหาคม 2547 สามารถตรวจพบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo- nitzschia* spp. ที่บริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดสมุทรปราการ พบว่าในเดือนพฤศจิกายน 2546 เกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีเป็นสีเขียว โดยพบแพลงก์ตอพืช *Pseudo-nitzschia* spp. พร้อมกับ *Noctiluca scintillans* และในเดือนธันวาคม 2546 มกราคม 2547 กุมภาพันธ์ 2547 และกรกฎาคม 2547 สามารถตรวจพบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. ที่บริเวณปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร พบว่าในเดือนพฤศจิกายน 2546 เกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีเป็นสีเขียว โดยพบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. พร้อมกับ *Noctiluca scintillans* และในเดือนธันวาคม 2546 กุมภาพันธ์ 2547 พฤษภาคม 2547 และสิงหาคม 2547 สามารถตรวจพบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. เช่นเดียวกัน ที่บริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง จังหวัดสมุทรสงคราม ในเดือนธันวาคม 2546 กุมภาพันธ์ 2547 มิถุนายน 2547 กรกฎาคม 2547 และสิงหาคม 2547 สามารถตรวจพบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp.

จากการศึกษาของอัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์ และคณะ (2552) บริเวณบ้านกระซ้าขาว จังหวัดสมุทรสาคร เดือนพฤศจิกายน 2550 ธันวาคม 2550 มกราคม 2551 กุมภาพันธ์ 2551 มีนาคม 2551 และพฤษภาคม 2551 และบริเวณบ้านบางบ่อ จังหวัดสมุทรสงคราม เดือนพฤศจิกายน 2550 และธันวาคม 2550 ตรวจพบแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. ซึ่งกล่าวได้ว่าจากการศึกษาที่บริเวณบ้านกระซ้าขาว จังหวัดสมุทรสาคร และบ้านบางบ่อ จังหวัดสมุทรสงคราม พบแพลงก์ตอนพืชที่สามารถสร้างสารชีวพิษได้เป็นชนิด *Pseudo-nitzschia pungens* และ *Pseudo-nitzschia* sp. โดยพบหนาแน่นมากในฤดูลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือและฤดูแล้ง การศึกษาของรวมทรัพย์ ชำนาญธนา (2547) พบปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีจาแพลงก์ตอนพืชกลุ่ม *Pseudo-nitzschia* spp. บริเวณชายฝั่งทะเลบางขุนเทียน จังหวัดกรุงเทพมหานคร และในเดือนมิถุนายน 2546 พบสกุล *Pseudonitzschia* เฉลี่ย $1x10^7$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เมตร (ศูนย์วิจัยทรัยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน , 2546ก) ปี 2533 เดือนมกราคม ถึง เดือนธันวาคม ที่บริเวณชายฝั่งมาบตาพุด พบแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp. (ประยูร สุรตระกูล, 2533 อ้างถึงใน สมภพ รุ่งสุภา และคณะ, 2546) และตั้งแต่ปากแม่น้ำบางปะกง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทราจนถึงต้นแม่น้ำบางปะกง ตำบลบางแตน อำเภอบ้านสร้าง

จังหวัดปราจีนบุรีพบแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp. เป็นชนิดเด่นทุกบริเวณที่เก็บตัวอย่าง 411,066 cell/ml (ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน, 2546ข) ในต่างประเทศมีรายงานระดับความหนาแน่นเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่มีพิษและผลกระทบที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดไว้อย่างชัดเจนเพื่อปฏิบัติตาม ทั้งนี้ค่ามาตรฐานที่ได้จากการศึกษาในต่างประเทศอาจไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในประเทศไทย เนื่องจากความแตกต่างในเรื่องชนิดแพลงก์ตอนพืชและปริมาณการสร้างสารพิษในแต่ละชนิด รวมทั้งความแตกต่างของสภาพสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นปัจจัยกระตุ้นการสร้างพิษแตกต่างกันด้วย (ชลธยา ทรงรูป, 2546) และความหนาแน่นของเซลล์กับปริมาณชีวพิษที่เซลล์สร้างขึ้นมามีความสำคัญมาก ซึ่งสารชีวพิษสามารถถ่ายทอดความเป็นพิษผ่านห่วงโซ่อาหารตามลำดับขั้นจนถึงมนุษย์ได้ (รวมทรัพย์ ชำนาญธนา, 2547)

2.7 พิษ ASP ในแพลงก์ตอนพืชที่เลี้ยง

จากการศึกษาของ Kotaki (2008) พบว่า *Pseudo-nitzschia* spp. หลายชนิดสามารถสร้างกรดโดโมอิกได้ และแต่ละชนิดสามารถผลิตกรดโดโมอิกได้แตกต่างกัน ซึ่งสามารถจัดกลุ่ม *Pseudo-nitzschia* spp.ที่สร้างกรดโดโมอิกในระดับสูง กลาง และต่ำ ดังแสดงในตาราง 2.5

ตารางที่ 2.5 แพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง ที่สามารถผลิตกรดโดโมอิกได้

Diatom	**ระดับกรดโดโมอิก**[a]	**ประเทศ**[b]
Pseudo-nitzschia multiseries	สูง	แคนนาดา
Pseudo-nitzschias australis	สูง	สหรัฐอเมริกา
Pseudo-nitzschia seriata	สูง	เดนมาร์ก
Pseudo-nitzschia delicatissima	ต่ำ	นิวซีแลนด์
Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima	ต่ำ	แคนนาดา
Pseudo-nitzschia pungens	ต่ำ	นิวซีแลนด์
Pseudo-nitzschia turgidula	ต่ำ	นิวซีแลนด์
Pseudo-nitzschia fraudulenta	ต่ำ	นิวซีแลนด์
Pseudo-nitzschia multistriata	ต่ำ	อิตาลี
Pseudo-nitzschia cuspidata	ต่ำ	ญี่ปุ่น
Pseudo-nitzschia subpacifica	ต่ำ	ญี่ปุ่น
Pseudo-nitzschia subfraudulenta	ต่ำ	ญี่ปุ่น
Pseudo-nitzschia heimii	ต่ำ	ญี่ปุ่น
Pseudo-nitzschia spp.	ต่ำ	ญี่ปุ่น
Amphora coffeaeformis	ต่ำ	แคนนาดา
Nitzschia navis-varingica	ปานกลาง	เวียดนาม

ระดับกรดโดโมอิกสูง : > 10 pg/cell, ระดับกรดโดโมอิกปานกลาง : 1-10 pg/cell และระดับกรดโดโมอิกต่ำ : < 1 pg/cell [a] คือระดับกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช [b] คือครั้งแรกที่รายงาน (ที่มา : Kotaki, 2008)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 การทำงานของ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การทำงานของ ELISA ที่เกี่ยวกับ enzyme และ antibody นั้นแบ่งออกเป็น 4 ลักษณะ คือ

1. Direct ELISA

เป็นแบบพื้นฐานของ ELISA เริ่มจากการเคลือบผิว solid phase ด้วย antigen ที่ต้องการตรวจตามด้วย antibody ที่ติดฉลากกับ enzyme เมื่อเติม substrate ก็จะปรากฏสีขึ้นมาปัจจุบันนี้นิยมใช้กันน้อยมาก

2. Direct antigen competitive ELISA

ส่วนใหญ่ใช้ในการตรวจหา antigen ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น mycotoxin (สารพิษจากเชื้อรา) ยาตกค้าง (Chloramphenicol ,β-antigonist) เริ่มต้นโดย microwell จะถูกเคลือบด้วย antibody ที่จำเพาะต่อ antigen ที่ต้องการหา (antibody ที่เคลือบผิวมีทั้ง Polyclonal antibody และ Monoclonal antibody แล้วแต่ผู้ผลิต) เติม antigen ที่ต้องการตรวจลงไปพร้อมกับ antigen ที่ติดฉลากด้วย enzyme (Conjugate) antigen ทั้งสองชนิดจะแย่งกันจับ antibody ที่เคลือบผิวไว้ (Competitive) antigen ชนิดที่มีปริมาณมากกว่าจะจับกับ antibody ได้มาก เมื่อเติม Substrate ก็จะได้สีที่ต่างกันตามจำนวนของ antigen และ Conjugate วิธีนี้ตรวจเพื่อทราบผลเพียงบวกหรือลบ (มี หรือ ไม่มี) สีที่เกิดมาจะเป็นตัวกำหนดให้ผลบวกลบ และตรวจเพื่อทราบความเข้มข้นของ antigen ชุดทดสอบเหล่านี้ ได้แก่ ชุดตรวจสอบหาสารพิษจากเชื้อรา ชุดตรวจหายาฆ่าแมลง ชุดตรวจเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น การตรวจนี้ต้องมีการเตรียมค่ามาตรฐาน (standard) ซึ่งแต่ละชุดทดสอบจะกำหนดแตกต่างกันไป ตั้งแต่ 4-7 ค่า ค่าเหล่านี้จะนำมาทำกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่า absorbance ของตัวอย่าง

3. Direct Antibody Comparative ELISA

วิธีนี้เคลือบผิวด้วย antigen จากนั้นเติม antibody (ส่วนมากใช้ antibody จาก serum) พร้อมกับ Conjugate (antibody ที่ติดฉลาก enzyme) วิธีนี้ปัจจุบันไม่ค่อยนิยมและชุดตรวจสอบที่ออกมาในรูปการค้าไม่ค่อยมีแล้ว

4. Indirect ELISA

วิธีนี้ใช้การตรวจหา antibody เป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในวงการแพทย์และสัตว์แพทย์ การเคลือบผิวด้วย antigen ที่จำเพาะ การเติมตัวอย่างจะเป็นตัว Serum ซึ่งอาจจะมีการเจือจางหรือไม่ ขึ้นอยู่กับชุดตรวจว่าแต่ละชุด antibody จะจับตัวกับ antigen ที่เคลือบไว้ตามด้วย antibody ตัวที่ 2 (antibody ตัวที่ 1) ซึ่งมีการติดฉลาก enzyme ไว้ (Conjugate) สุดท้ายเป็น substrate และจากที่ได้กล่าวว่า ELISA test kit ทำงานเกี่ยวข้องกับ enzyme และ antibody ที่มี

ความไว และความเฉพาะเจาะจงต่อสารที่เราจะตรวจวิเคราะห์ทั้งปริมาณและคุณภาพวิเคราะห์ (สไบ กุศลส่ง และ วนิชชา ศรีบ้านดู่, 2547)

วัสดุสำหรับยึดแอนติเจนหรือแอนติบอดี (solid phase)

วิธี ELISA วัสดุที่ใช้ยึดแอนติเจนหรือแอนติบอดีมีความสำคัญมากต่อการทดสอบ ถ้าแอนติเจนหรือแอนติบอดีจับกับวัสดุนั้นได้ไม่ดีพอจะมีผลทำให้การทดสอบมีความไวลดลง ในกรณีที่การจับของแอนติเจน หรือแอนติบอดีกับวัสดุนั้นเกิดขึ้นอย่างไม่สม่ำเสมอ จะทำให reproducibility ของการทดสอบลดลง ซึ่งจะทำให้ความน่าเชื่อถือของการทดสอบนั้นลดลงด้วย ความสามารถของวัสดุต่างๆในการนยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีเกี่ยวข้องกับลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของวัสดุนั้น ความสามารถนี้จะเปลี่ยนแปลงไปได้ในระหว่างขั้นตอนของการผลิตจากโรงงานและการเก็บรักษาก่อนที่จะนำมาใช้ ในปัจจุบันนี้มีวัสดุหลายชนิดที่ใช้สำหรับการยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีโดยไม่ได้ใช้ covalent bond ในการจับนั้น ได้แก่ polyvinyl, polypropylene, polystyrene, polycarbonate, แก้ว, nylon, silicone rubber สำหรับพวกที่เป็นพลาสติกนั้นมีการประดิษฐ์ให้อยู่ในรูปต่างๆ เช่น tube, cuvette, beads, microplate ซึ่งทำได้ง่ายต่อการล้างในระหว่างขั้นตอนของการทดสอบเพราะไม่ต้องปั่นก่อนล้างซึ่งต่างจากวัสดุที่อยู่ในรูปของ particle สำหรับวัสดุบางอย่างการยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีโดยใช้ covalent bond เช่น cellulose, agarose, polyacrylamine, cyanogens bromide activated paper การใช้วัสดุเหล่านี้ในการทดสอบ จะทำให้ได้ผลที่แน่นอนกว่า เพราะการจับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับวัสดุดังกล่าวมั่นคงและมีความผันแปรน้อย แต่วัสดุเหล่านี้มักจะอยู่ในรูปที่เป็น particle ทำให้มีความยุ่งยากในขั้นตอนของการล้าง วัสดุที่ใช้ยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือพวกที่ร่อยู่ในรูป microplate การจับของแอนติเจนหรือของอิมมูโนโกลบุลินกับผิววัสดุนี้มีความผันแปรแตกต่างกันไปได้นับตั้งแต่ระหว่าง plate ที่ทำด้วยวัสดุต่างชนิดกัน plate ที่ทำด้วยวัสดุชนิดเดียวกันแต่ผลิตจากต่างโรงงานกัน plate ที่ผลิตออกมาจากโรงงานเดียวกันแต่ต่างรุ่นกันหรือแม้แต่กระทั่ง plate ภายในรุ่นเดียวกัน หรือภายใน plate เดียวกันแต่ต่างหลุมกันก็พบความแตกต่างดังกล่าวนี้ได้ ดังนั้นการจะเลือกใช้ plate ชนิดใดก็แล้วแต่ระบบของแอนติเจนและแอนติบอดีที่จะทำการทดสอบ แต่ควรจะคงใช้ plate ชนิดเดียวไปตลอดสำหรับระบบนั้นๆ เพื่อให้การทดสอบนั้นมีมาตรฐานที่ดี (นภาธร บานชื่น , 2530)

การยึดติดของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับผิววัสดุที่เป็นพลาสติก

แอนติเจนที่เป็น polysaccharide จะยึดติดกับ polystyrene plate ได้ไม่ค่อยดีเท่าโปรตีน ปกติการจับของโปรตีนกับผิวพลาสติกเกิดจากปฏิกิริยา electrostatic, electrokinetic และ hydrophobic แต่ส่วนใหญ่เป็นปฏิกิริยา hydrophobic ปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เคลือบผิวพลาสติกและอัตราเร็วของขบวนการนี้ขึ้นกับ diffusion coefficient ของสารนั้น และขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่าง ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างพื้นผิวที่ใช้กับปริมาตรของสารที่นำมาเคลือบ ความเข้มข้นของสารที่ใช้เคลือบพื้นผิวนั้น รวมทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้สำหรับขบวนการนี้ด้วย ปริมาณของโปรตีนที่ติดกับพื้นผิวพลาสติกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ แต่เมื่อเทียบอัตราส่วนของโปรตีนที่ติดกับโปรตีนที่ใช้ พบว่าเมื่อใช้โปรตีนความเข้มข้นสูงอัตราส่วนของโปรตีนที่ติดกับผิวพลาสติกต่อโปรตีนที่ใช้มีค่าต่ำลง ดังนั้นในกรณีที่ต้องการประหยัดก็ไม่จำเป็นต้องใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงมากเกินไป เพราะผลที่ได้ไม่คุ้มกัน โดยทั่วไปความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่จะนำมาเคลือบผิวพลาสติกอยู่ระหว่าง 1 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การใช้โปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงมากไปจะมีผลทำให้โปรตีนที่ติดกับผิวพลาสติกนั้นหลุดออกได้ภายหลัง โดยทั่วไปแล้วการเคลือบผิวพลาสติกด้วยโปรตีนได้ผลดี ทำที่อุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลานาน 2 ชั่วโมง หรืออาจทิ้งไว้จนข้ามคืน หรืออาจจะใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานข้ามคืน หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 -5 ชั่วโมง (นภาธร บานชื่น , 2530)

ขั้นตอนการของการล้างในระหว่างการทดลอง

การทำ ELISA จำเป็นต้องมีการล้างเอาตัวกระทำส่วนเกินออกในระหว่างการทดลองแต่ละขั้นตอน ตั้งแต่หลังจากเคลือบผิววัสดุด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดี หลังจากอบกับสิ่งส่งตรวจ และ conjugate ในการล้างจะต้องระวังอย่าให้มีการปนเปื้อนจากขั้นตอนหนึ่งไปยังอีกขั้นตอนหนึ่ง ถ้าวัสดุที่ใช้อยู่ในรูป plate การล้างจะทำได้ง่ายมาก เพียงแต่คว่ำเอาตัวกระทำที่ใช้ในขั้นตอนนั้นออให้หมด เติมสารละลายที่ใช้สำหรับล้างลงไปให้เต็มทุกๆหลุมใน plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที แล้วคว่ำ plate เพื่อเทสารละลายนั้นทิ้งให้หมด ในปัจจุบันการล้าง plate อาจทำได้ง่ายกว่านี้ เนื่องจากมีเครื่องมือสำหรับล้าง plate อัตโนมัติจำหน่ายแล้ว แต่ถ้า solid phase ที่ใช้เป็น particle จะต้องมีการปั่นให้ particle นั้นนอนก้นเสียก่อนจึงจะล้างได้ โดยทั่วไปการล้าง 3 ครั้ง ในระหว่างแต่ละขั้นตอนจะเพียงพอที่จะทำให้ได้ผลการทดลองที่ดี การล้างผิวพลาสติกที่มีโปรตีนติดอยู่นี้มีผลทำให้โปรตีนนั้นหลุดออกมาได้ การล้างผิววัสดุที่เคลือบด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดีใน ELISA

นั้น โดยทั่วไปใช้ phosphate buffered saline ซึ่งมี Tween 20 อยู่ด้วย หรืออาจใช้ saline ซึ่งมี Tween 20 ผสมก็ได้ ความเข้มข้นของ Tween 20 ที่ผสมในสารละลายดังกล่าวอาจใช้ได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.05 (ปริมาตร/ปริมาตร) จนถึง 0.5 Tween 20 เป็น nonionic detergent ซึ่งไม่รบกวนปฏิกิยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แต่ป้องกันมิให้เกิดปฏิกิริยา hydrophobic ระหว่างโปรตีนที่เติมที่เติมลงไปใหม่กับผิวพลาสติกที่ใช้ยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีอยู่ก่อนแล้ว โดยไม่ทำลายการยึดจับแบบ hydrophobic ระหว่างแอนติเจน หรือแอนติบอดีกับผิวพลาสติกที่มีอยู่แล้วในปริมาณที่จะมีผลเสียต่อการทดลอง ดังนั้นจึงเป็นการช่วยป้องกันมิให้เกิดการยึดจับของโปรตีนอื่นๆ กับผิวพลาสติกอย่างไม่จำเพาะในขั้นตอนต่อไปด้วย (นภาธร บานชื่น , 2530)

Conjugate

Conjugate ที่ใช้ใน ELISA อาจเป็นอิมมูโนโกลบุลินที่ติดฉลากด้วย enzyme ซึ่งใช้กันอยู่โดยทั่วไป นอกจากนี้ยังมีการนำ enzyme มาติดฉลากกับแอนติเจน enzyme ที่ดีเหมาะสำหรับใช้ติดฉลาก ควรเป็น enzyme ที่มีความคงทนและมีความไวในการทำปฏิกิริยาสูง (highly reactive) สามารถนำมาใช้ในการติดฉลากได้โดยที่ enzyme นั้นและแอนติเจนหรอแอนติบอดี ที่ใช้จะมีการสูญเสียหน้าที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด conjugate ที่เตรียมขึ้นจาก enzyme นั้นจะต้องมีความคงทน นอกจากนี้ enzyme ที่จะนำมาใช้ควรเป็นชนิดที่ไม่มีอยู่ในสารน้ำต่างๆของร่างกาย ราคาถูก หาง่าย การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ substrate ทำได้ง่าย อีกประการหนึ่งก็คือ ทั้ง enzyme และ substrate ของ enzyme นั้น รวมทั้ง cofactor ที่ใช้ในปฏิกิริยา จะต้องไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพแล้ว enzyme ที่มีผู้ลองใช้แล้วสำหรับการทำ conjugate ได้แก่ acetyl cholinesterase, cytochrome, β-D-galactosidase, glucoamylase, glucose oxidase, β-D-galactosidase, lactate dehydrogenase, lactoperoxidase, ribonuclease tyrosinase, alkaline phosphatase และ horseradish peroxidase อย่างไรก็ตาม enzyme นิยมใช้มากในปัจจุบัน คือ alkaline phosphatase, horseradish peroxidase และ β-D- galactosidase (นภาธร บานชื่น , 2530)

การจะเลือก enzyme ชนิดใดสำหรับใช้ในการทดสอบระบบไหนต้องคำนึงถึงว่าในสิ่งส่งตรวจที่นำมาใช้ในระบบไม่ควรมีสารซึ่งจะรบกวนปฏิกิริยาของ enzyme หรือการวัดปฏิกิริยาของ enzyme หรือการวัดปฏิกิริยาของ enzyme ที่ใช้ โดยเฉพาะเมื่อจะทำการทดสอบซึ่งจำเป็นต้องอบ conjugate ร่วมกับสิ่งส่งตรวจดังเช่น ในกรณีของ competitive ELISA หรือกรณีของ homogeneous EIA สำหรับกรณีของ non – competitive ELISA ซึ่งมีการแยกเอาสิ่งส่งตรวจออกจากระบบการทดสอบก่อนที่จะเติม conjugate ลงไปนั้นการรบกวนดังกล่าวจะมีผลได้น้อยกว่า Substrate ซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับนำมาใช้ในวิธี ELISA คือ substrate ที่จะช่วยให้สามารถตรวจ enzyme ใน conjugate ได้ไว ส่วนใหญ่จะใช้ chromogenic substrate ซึ่งเดิมไม่มีสีและเมื่อทำ

ปฏิกิริยากับ enzyme แล้วจะให้สีเข้ม substrate ที่ดีจะต้องให้ผลิตผลที่ละลายได้หมดและมี extinction coefficient สูง คือแต่ละหน่วยของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงนั้นจะเกิดสีเข้มชัดเจน นอกจากนี้ควรมีราคาถูก ปลอดภัย และใช้ง่าย สำหรับการทดสอบเพื่อจุดประสงค์บางอย่างใช้ fluorogenic substrate ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบ chromogenic substrate กับ fluorogenic substrate พบว่า enzyme ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ fluorogenic substrate ได้น้อยกว่า chromogenic substrate แต่เนื่องจากวิธีการตรวจ fluorogenic substrate มีความไวกว่าจึงทำให้สามารถตรวจพบ enzyme ที่มีปริมาณน้อยกว่าได้เมื่อใช้ fluorogenic substrate ซึ่ง chromogenic substrate ที่ใช้กับ enzyme ชนิด horseradish peroxidase เป็นสารที่เปลี่ยนสีเมื่อถูก oxidized โดย H_2O_2 ซึ่งขบวนการ oxidation นี้เกิดตามมาเมื่อ H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับ horseradish peroxidase สำหรับ substrate ดังกล่าวนี้มีหลายชนิด ได้แก่ o-Phenylenediamine (OPD) ให้สีส้ม o-Dianisidine ให้สีส้มเหลือง aminosalicylic acid (5-AS) ให้สีน้ำตาลบนม่วง หรือดำ o-tolidine ให้สีน้ำตาล tetremethylbenzidine (TMB) ให้สีฟ้า (นภาธร บานชื่น , 2530)

จากการศึกษาของ Hui et al (2007) กล่าวว่าชุดตรวจสอบ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีที่ใช้หากรดโดโมอิกในระดับพิโกกรัม

2.9 โครมาโทกราฟีเหลว (liquid chromatography)

โครมาโทกราฟี (chromatography) คือ วิธีการแยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติที่ต่างกันของสารนั้นๆ ที่มีต่อวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โครมาโทรกราฟีเหลว (liquid chromatography) อาจแบ่งตามชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ และวัฏภาคนิ่งได้แสดงดังตารางที่ 2.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. 6 โครมาโทรกราฟีเหลว (liquid chromatography) แบ่งตามชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคนิ่ง

โครมาโทรกราฟีเหลว (liquid chromatography)	**วัฏภาคเคลื่อนที่** (mobile phase)	**วัฏภาคนิ่ง** (stationary phase)
Adsorption	ของเหลว	ของแข็ง
Partition	ของเหลว	ของเหลว
Size exclusion	ของเหลว	ของแข็ง
Ion - exclusion	ของเหลว	ของเหลว
Bonded - phase	ของเหลว	ของเหลว
Ion - pair	ของเหลว	ของเหลว

(ที่มา : แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535)

ทฤษฏีการแยกออกจากกันของสารและการเกิดแถบกว้าง (band broadening)

สารที่ผสมกัน เช่น สารผสมกัน 3 ตัว (A, B และ C) แยกจากกันได้เมื่อผ่านวัฏภาคนิ่งของสารทั้ง 3 แตกต่างกัน (differential migration) ถ้าการเคลื่อนที่ของสารทั้ง 3 บนวัฏภาคนิ่งเท่ากันการแยกจะไม่เกิดขึ้น การเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันของเหล่าสารนี้เป็นผลจาก equilibrium distribution ที่แตกต่างกันของสารทั้ง 3 ระหว่างวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่

โครมาโทแกรม

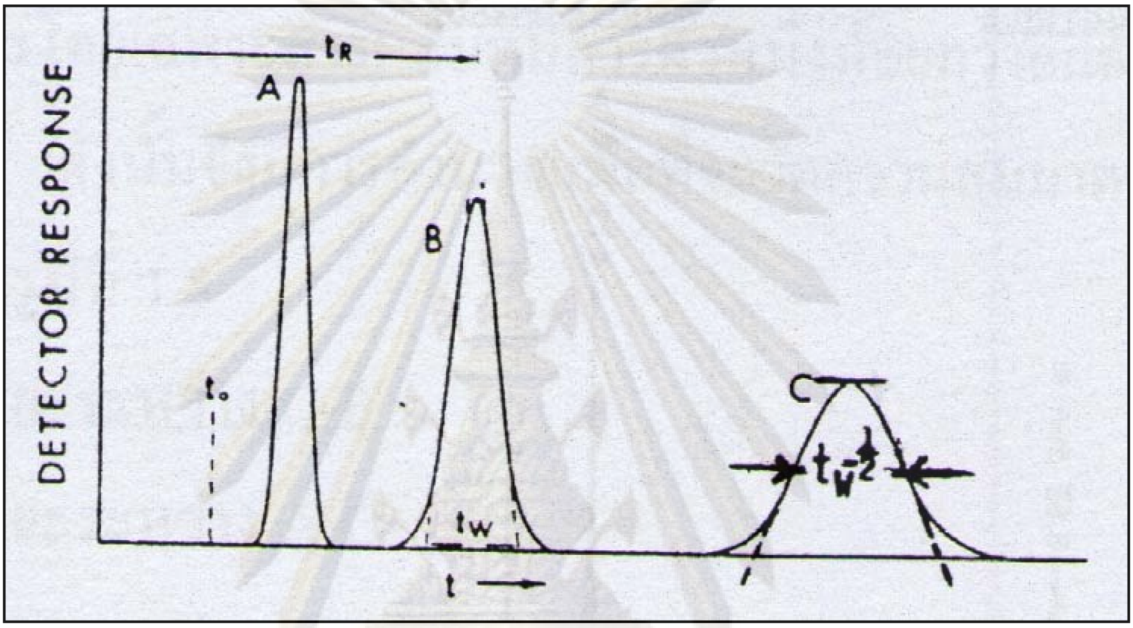
เมื่อสารผสมผ่านคอลัมน์ไปยังเครื่องตรวจวัด ความเข้มข้นของสารเหล่านั้นจะถูกบันทึกออกมาพร้อมกับเวลาที่ใช้ในการแยก ผลที่ได้เรียกโครมาโทแกรม (chromatogram) ใช้ในการอธิบายผลของการแยก ซึ่งมีลักษณะเฉพาะอยู่ 4 อย่างคือ

1. สารแต่ละตัวออกจากคอลัมน์ในรูปแบบของแถบ หรือ พีกที่สมมาตร หรือรูประฆัง อาจเรียกว่า Gaussian curve

2. สารแต่ละตัวออกจากคอลัมน์ด้วยเวลาเฉพาะ ณ สภาวะหนึ่งๆ ซึ่งสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารนั้นได้ เรียกเวลาของการคงไว้ (retention time, t_R) วัดจากเวลาที่เริ่มฉีดสารตัวอย่างจนถึงจุดสูงสุดของพีกของสารนั้น

3. ค่าเวลาของการคงไว้ของสารที่อยู่ติดกัน ยิ่งต่างกันมาก การแยกออกจากกันของสารทั้ง 2 ก็ยิ่งดี

4. แถบของสารแต่ละตัวที่ออกจากคอลัมน์จะเป็นพีก การลากเส้นสัมผัสสองข้างของพีกมาจรดเส้นฐานแล้ววัดความกว้างของส่วนฐานเรียก band width (t_w) พีก แสดงดังรูปที่ 2.4 การแยกของสารจะดี ถ้าแถบของสารนี้แคบหรือมีค่า band width น้อย



รูปที่ 2.4 โครมาโทแกรมของสารที่แยกได้ดี (ที่มา : แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535)

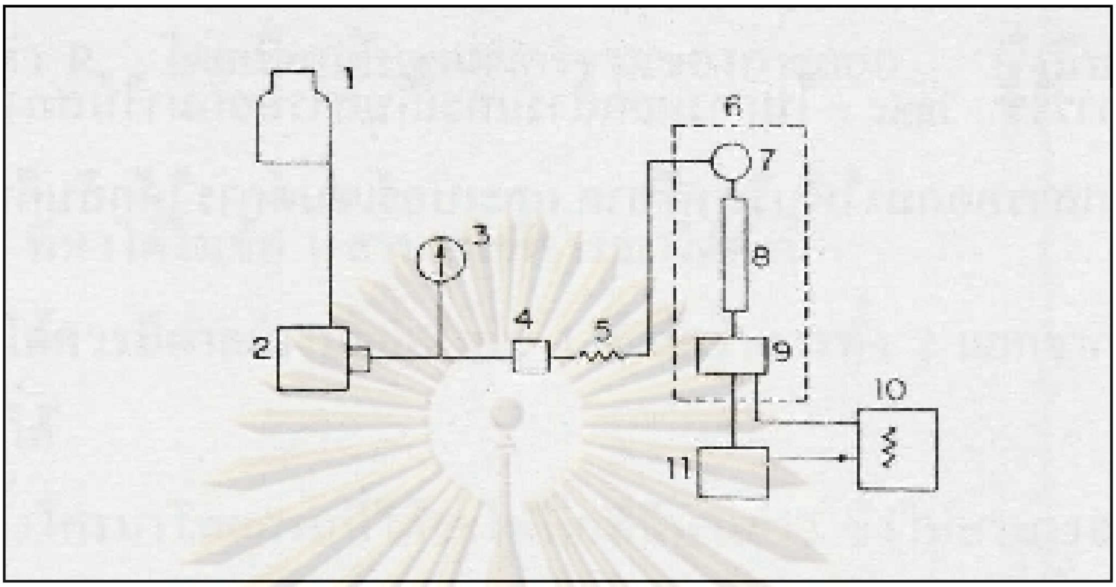
ระบบ HPLC

ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 6 ส่วนแสดงดังรูป 2.5 คือ

1. ขวดบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่
2. เครื่องสูบ HPLC
3. เครื่องฉีดตัวอย่าง
4. คอลัมน์โครมาโทกราฟี
5. เครื่องตรวจวัด
6. เครื่องบันทึกผลหรือเครื่องประมวลหรือเครื่องคอมพิวเตอร์

นอกจากนี้ยังอาจประกอบด้วยส่วนย่อยๆ อีกหลายส่วน เช่น ส่วนวัดความดัน, ท่อกรอง, pulse damper และตู้ควบคุมอุณหภูมิ (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.5 แผนผังของเครื่องโครมาโทกราฟีอย่างง่าย (1) ขวดบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ (2) เครื่องสูบ (3) ส่วนวัดความดัน (4) ท่อกรอง (5) pulse damper (6) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (7) เครื่องฉีดตัวอย่าง (8) คอลัมน์โครมาโทกราฟี (9) เครื่องตรวจวัด (10) เครื่องบันทึกผล (11) เครื่องจัดการข้อมูล (ที่มา : แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535)

สารมาตรฐาน (Standards **หรือ** Reference Materials)

สารมาตรฐานเป็นสิ่งสำคัญและถือเป็นหัวใจของการวิเคราะห์ทางเคมี เพราะผลการวิเคราะห์จะถูกต้องหรือไม่ขึ้นอยู่กับคุณภาพของสาร มาตรฐาน ประกอบกับการวิเคราะห์ทางเคมีส่วนใหญ่เป็นการวิเคราะห์แบบเปรียบเทียบ (comparative) กับสารมาตรฐาน ดังนั้น ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่ทันสมัย จำเป็นจะต้องมีสารมาตรฐานอย่างดี สารมาตรฐานยังใช้สำหรับ calibrate เครื่องมือวิเคราะห์อีกด้วย (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม,2535)

สารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC ต้องมีความสะอาดมากพอจึงจำเป็นต้องมีวิธีเพื่อกำจัดสารสกปรกต่างๆ ออกไปก่อน เพราะอาจทำให้เกิดการอุดตันของคอลัมน์หรือมีผลรบกวนการวิเคราะห์ค่อนข้างมาก เช่น การเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้เทคนิค Solid phase extraction (SPE) เป็นเทคนิคการสกัดสารด้วยเฟสของแข็งโดยใช้คอลัมน์หรีตลับ (cartridge) ขนาดเล็กที่บรรจุด้วยวัฏภาคคงที่ภายใน อาจจะเป็นซิลิกา โอดีเอส (ODS, C18) ขึ้นกับวัตถุประสงค์ว่าต้องการสกัดสารกลุ่มไม่มีขั้วออกจากสารตัวอย่าง (Non polar extraction) การเตรียมตัวอย่างโดย

ใช้เทคนิค SPE ทำได้โดยการผ่านสารละลายตัวอย่างไปบนคอลัมน์ที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการสกัด สารกลุ่มอื่นที่ไม่ต้องการจะไม่ดูดซับอยู่อยู่ในคอลัมน์และไหลออกไป จากนั้นให้ชะล้างสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม นำไประเหยทำให้เข้มข้นขึ้นเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป โดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนเป็นวงกลม (Rotary evaporator) คือการใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนเป็นวงกลม ภายใต้การลดความดัน ทำให้ตัวทำละลายระเหยได้เร็วขึ้นที่อุณหภูมิต่ำลง โดยอุณหภูมิที่ใช้ไม่ควรเกิน 40-60 องศาเซลเซียส เป็นการระเหยเพื่อกำจัดหรือลดปริมาตรตัวทำละลายออกจากสารละลายตัวอย่างเพื่อทำให้สารละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้น (ปนัดดา พัฒนวศิน, 2550)

จากตารางที่ 2.7 คือ HPLC ที่ใช้ระบบแตกต่างกัน ตารางที่ 2.8 คือวิธีการสกัด และเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง เพื่อการหากรดโดโมอิก และตารางที่ 2.9 คือวิธีการตรวจหากรดโดโมอิก และค่าต่ำสุดของแต่ละวิธีที่สามารถตรวจหากรดโดโมอิกในสัตว์น้ำ เช่น ใช้ UV เป็นตัวตรวจวัด ความยาวคลื่น 242 nm ขนาดความยาว Column 25 เซนติเมตร กว้าง 2.1 เซนติเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร /นาที และ mobile phase ใช้ acetonitrile : H_2O : trifluoroacetic acid ในอัตราส่วน 10 : 89.9 : 0.1 พบว่าค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในสัตว์น้ำ 400 ng/g

ตารางที่ 2.7 HPLC ที่ใช้ระบบแตกต่างกัน เพื่อการหาปริมาณกรดโดโมอิก

Laboratory	Mobile phase		HPLC column type	
(detection system)	ACN (%)	Additive	Guard	Analytical
LC-UV	10	0.1% TFA	10 x 4.6 mm, 5 µm Purosphere	250 x 4.6 mm, 5 µm Spherisorb ODS2
LC-UV	10	0.1% TFA	10 x 4.6 mm, 5 µm Vudac 201 GK54T	250 x 4.6 mm, 5 µm Vudac 201 TP54
LC-MS	9.5	2 mM AF +50mM FA	10 x 2 mm, 3 µm BOS Hypersil C8	50 x 2 mm, 3 µm BOS Hypersil C8
LC-UV	15	0.1% TFA	4 x 4 mm, 5 µm Lichrochart RP 18e	250 x 4.0 mm, 5 µm Lichrosphere RP18e
LC-UV	10	0.1% TFA	None	250 x 4.6 mm, 10 µm Vudac 201 TP104
LC-MS	12.5	0.1% FA	30 x 4.6 mm, 5 µm Sphereclone ODS2	250 x 4.6 mm, 5 µm Sphereclone ODS2

หมายเหตุ : AF, Ammonium formate ; FA , Formic acid ; TFA, Trifluoroacetic acid. (ที่มา : Hess et al., 2005)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

33

ตารางที่ 2.8 วิธีการสกัด และเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง เพื่อการหาปริมาณกรดโดโมอิก

Laboratory	LLOD (µg/g)	Extraction		Clean-up					
		Sample weight (g)	Solvent amount (ml)	SAX cartridge type: Size	SAX cartridge type: Manufacturer	Conditioning	Sample load (mL)	Wash (mL)	Elution (mL)
LAB-1	2.5	4±1	16±1(MeOH:H_2O, 1:1; v:v)	0.5 g	Waters QMA	3 mL MeOH, 6 mL MeOH:H_2O (1:1;v:v)	5	5 mL 10% CAN; 0.3 CAB	2 mL CAB
LAB-2	1.0	4±0.1	16±0.1(MeOH:H_2O, 1:1; v:v)	0.5 g	IST Isolute	6 mL MeOH, 3 mL H_2O 3 mL MeOH:H_2O (1:1;v:v)	5	5 mL 10% CAN; 0.3 mL CAB	2 mL CAB
LAB-3	1.0	4±1	16±1(MeOH:H_2O, 1:1; v:v)	3 ml	Supel clean LC-SAX	6 mL MeOH, 3 mL H_2O 3 mL MeOH:H_2O (1:1;v:v)	5	5 mL 10% ACN; 0.5 mL CAB	2 mL CAB
LAB-4	0.6	4±1	20±1(MeOH:H_2O, 2:1; v:v)	0.5 g	IST Isolute	6 mL MeOH, 3 mL H_2O 3 mL MeOH:H_2O (1:1;v:v)	3 x 1	3 mL 10% ACN	3 mL CAN:H_2O:FA (10:88:2)

หมายเหตุ : LLOD ,Lower limit of determination of DA; CAB, Citric acid buffer; ACN, Acetonitrile ; FA, Formic acid; SAX, Strong anion exchange. (ที่มา : Hess et al., 2005)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.9 วิธีการตรวจหากรดโดโมอิก และค่าต่ำสุดของแต่ละวิธีที่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิในสัตว์น้ำ

Toxin class	Detection method	Derivatization	Detection limit in shellfish
ASP	UV 242 nm	None	400 ng/g
		SAX cleanup	20-30 ng/g
	Fluorescence	FMOC	15 pg/ml
	LC-MS		10 ng/g

หมายเหตุ : FMOC คือ fluorenylmethoxycarbonyl (ที่มา : Garthwaite, 2000)

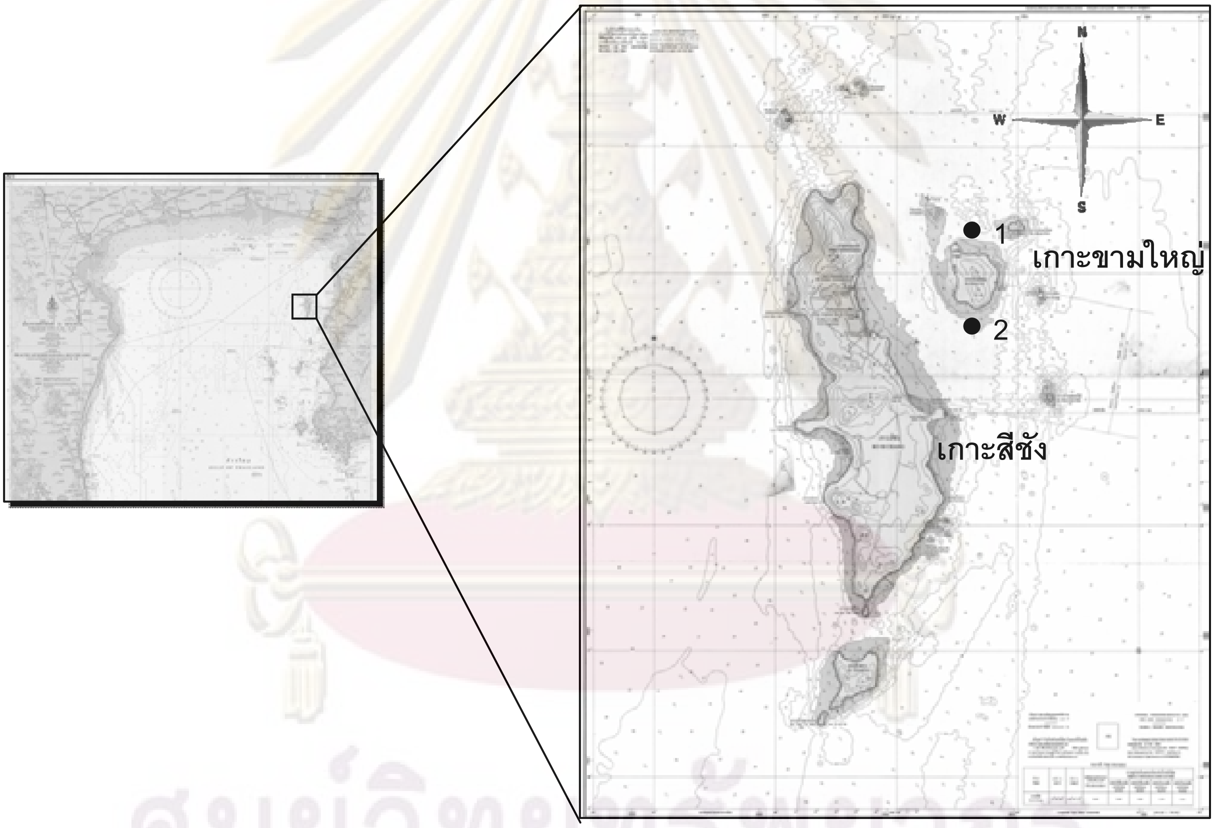
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 พื้นที่ศึกษา

ดำเนินการเก็บตัวอย่างที่เกาะขามใหญ่ ตำบลท่าเทววงษ์ อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี สถานี1 ละติจูดที่ 13 องศา 10.216 ลิปดาเหนือ ลองติจูดที่ 100 องศา 49.568 ลิปดาตะวันออก และสถานี 2 ละติจูดที่ 13 องศา 9.707 ลิปดาเหนือ ลองติจูดที่ 100 องศา 49.710 ลิปดาตะวันออก (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างเกาะขามใหญ่ ตำบลท่าเทววงษ์ อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี
● 1 คือสถานี 1 (ทิศเหนือเกาะขามใหญ่) ละติจูดที่ 13 องศา 10.216 ลิปดาเหนือ ลองติจูดที่ 100 องศา 49.568 ลิปดาตะวันออก และ ● 2 คือสถานี 2 (ทิศใต้เกาะขามใหญ่) ละติจูดที่ 13 องศา 9.707 ลิปดาเหนือ ลองติจูดที่ 100 องศา 49.710 ลิปดาตะวันออก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ระยะเวลาในการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง ตั้งแต่ เดือนพฤษภาคม 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2552 คือ

1. ในฤดูลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (SW) เดือน พฤษภาคม 2551 และ กันยายน 2551
2. ในฤดูลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (NE) เดือน ธันวาคม 2551 และ กุมภาพันธ์ 2552

และเก็บตัวอย่างหอยนางรมหนามเพิ่มเติมอีกคือเดือน พฤษภาคม 2552

3.3 สถานที่ในการศึกษา

ห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนวิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินการศึกษา

3.4.1 **การศึกษาในภาคสนาม**

1. การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่คาดว่าเป็นสาเหตุของการสะสมกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor*

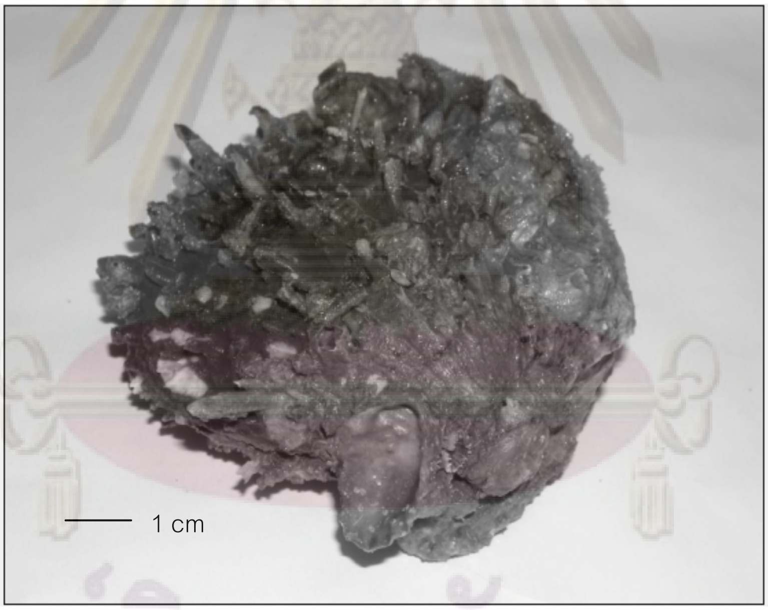
เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากน้ำทะเลทั้งสองสถานี ที่ระดับ 0.5 เมตร จากผิวน้ำทะเล และที่ระดับ 0.5 เมตร จากพื้นทะเล ระดับละ 20 ลิตร กรองน้ำทะเลที่เก็บผ่านถุงกรองขนาด 20 ไมโครเมตร เพื่อแยกตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่มีขนาดเซลล์ใหญ่กว่า และเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร (รูปที่ 3.2) เนื่องจากต้องการทราบขนาดแพลงก์ตอนพืชที่สร้างกรดโดโมอิกจึงทำการแยกแพลงก์ตอนพืชออกเป็นสองขนาด และตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่ได้ในสภาพที่มีชีวิตจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกใช้ในการคัดลือกเซลล์และเพาะเลี้ยงต่อไป ส่วนที่สองใช้ในการสกัดพิษ

2. การเก็บตัวอย่างหอยนางรมหนาม

ทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* (รูปที่ 3.3) บริเวณทิศเหนือ และทิศใต้ของเกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี 5 ครั้งๆ ละ 30 ตัว เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดโดโมอิก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.2 วิธีการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากน้ำทะเล บริเวณ เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี



รูปที่ 3.3 หอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* บริเวณ เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

1. การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างน้ำทะเล

ทำการแยกแพลงก์ตอนพืชกลุ่มที่ผลิตกรดโดโมอิก ออกจากแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่นๆของตัวอย่างน้ำโดยใช้เทคนิคหลอดแก้วปลายแหลมตามวิธีของ (Hoshow และ Rosowski, 1973 อ้างถึงใน ชลธยา ทรงรูป, 2541) และล้างเซลล์ทีละเซลล์เป็นจำนวน 5 ครั้ง เพื่อขจัดแบคทีเรียและสิ่งสกปรกที่เกาะอยู่ที่เซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรT_1 (Ogata et al., 1987) ที่ฆ่าเชื้อแล้วดัดแปลงโดยการเติมซิลิเกต จากนั้นดูดเซลล์ที่ล้างแล้วใส่ลงในจานหลุมพลาสติก ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร T_1 บรรจุอยู่หลุมละ 1 เซลล์ แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ และ light : dark cycle เท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง

2. การสกัดกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช และตัวอย่างหอยนางรมหนาม

2.1 การสกัดกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล

1. นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่มีขนาดเซลล์ใหญ่กว่า และเล็กกว่า 20 µm จำนวน 6 และ 4 ลิตร ตามลำดับ กรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว GF/F (Glass Microfibre Filters) จะได้ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชสองขนาดบนกระดาษกรองใยแก้ว GF/F

2. วางแผ่นกระดาษกรองใยแก้ว GF/F ในข้อ 1 ไว้ในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่น 2 ml นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 5 – 10 นาที เนื่องจากกรดโดโมอิกละลายได้ดีในน้ำ

3. นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชเหวี่ยงแยกสาร 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

4. นำตัวอย่างที่ได้ส่วนที่เป็นของเหลวไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดโมอิกด้วยชุดตรวจสอบ ELISA ทำตามวิธีของ Ha et al. (2006) และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2.2 การสกัดพิษของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง

นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง ทำเหมือนข้อ 2.1

2.3 การสกัดพิษของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor*

1. นำอวัยวะส่วนต่างๆของหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* คือ digestive glands , adductor muscle และ gonad จำนวน 4-10 ตัว บดอวัยวะแต่ละส่วนให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น

2. เติม 50 % เมทานอล 4 ml ต่อน้ำหนักหอยนางรมหนาม 1 g ตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ^{0}C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

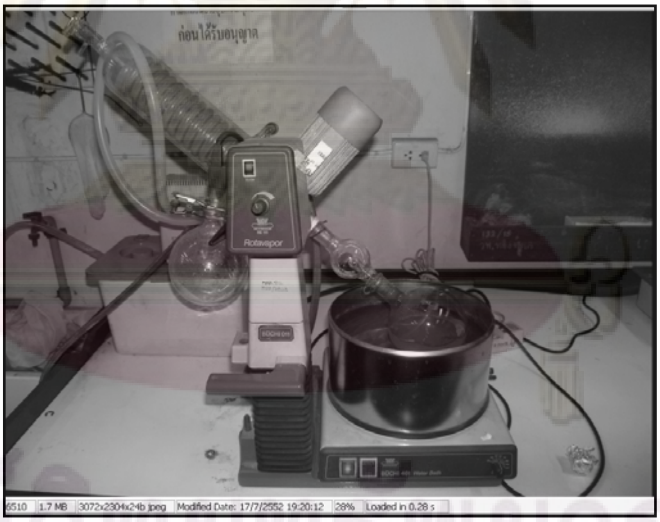
3. นำตัวอย่างหอยนางรมหนามไปเหวี่ยงแยกสาร (Centrifuge) 10,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที

4. นำตัวอย่างหอยนางรมหนามส่วนที่เป็นของเหลวไประเหยเมทานอลโดยใช้เครื่อง Rotary Vacuum Evaporator อุณหภูมิ 60 ^{0}C (รูปที่ 3.4)

5. ชะตัวอย่างหอยนางรมหนามด้วย phosphate buffered saline (PBS) เติม Acetic acid ปรับค่า pH 2-3 กรองผ่าน Sep-Pak C18 cartridge

6. ขั้นตอนการผ่าน Sep-Pak C18 cartridge มีวิธีการดังนี้ เตรียม packing (C18) ที่บรรจุอยู่ในแท่ง Sep-Pak cartridge ให้พร้อมสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยการเติมเมทานอล 100% 10 ml เติมน้ำกลั่น 10 ml และเติมกรดอะซิติก 100% 5 ml ลงใน Sep-Pak cartridge ตามลำดับ จากนั้นกรองตัวอย่างสารละลายที่สกัดได้จากหอยนางรมหนามผ่าน Sep-Pak C18 cartridge และเติมเติมเมทานอล 50% 2 ml เพื่อชะกรดโดโมอิกออกจาก Sep-Pak cartridge จึงนำตัวอย่างหอยนางรมหนามกรองผ่าน nylon membrane ขนาด 0.45 µm

7. นำตัวอย่างหอยนางรมหนามส่วนที่เป็นของเหลวไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดโมอิกด้วยชุดตรวจสอบ ELISA ทำตามวิธี ของ Ha et al. (2006) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



รูปที่ 3.4 เครื่อง Rotary Vacuum Evaporator อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช และตัวอย่างหอยนางรมหนาม ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

3.1 การเตรียม 8-well microtiter plate **เพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี** ELISA

1. ทำ Coating reagent โดยละลาย domoic acid 1 mg ลงในสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 20 ml ดูดสารละลาย domoic acid หรือ Coating reagent ใส่ใน 8-well microtiter plate หลุมละ 100 µl หุ้มด้วยพลาสติกใส่ไว้ในตู้เย็น 1 คืน

2. ดูดสารละลาย domoic acid กลับไปเก็บในขวดเช่นเดิม หลังจากนั้นนำ plate ไปล้างด้วย 0.1% Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBST) 2 ครั้ง

3. ทำ Blocking reagent โดยใส่ gelatin 0.1 g ผสมกับ Phosphate Buffer Saline (PBS) 30 ml ให้ความร้อนโดยการต้มน้ำให้มีอุณหภูมิ 90 ^{0}C จนกระทั่งสารละลายละลายเข้ากันดี (ประมาณ 5-10 นาที) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น

4. ใส่ Blocking reagent ในแต่ละหลุมๆละ 300 µl แล้วปิดผนึกด้วยพลาสติกใส แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.เท Blocking reagent ในแต่ละหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วย 0.1% Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBST) 2 ครั้ง ปิดด้วยเทปใส เก็บไว้ในตู้เย็นได้ 2 สัปดาห์ถ้าหากยังไม่ทดสอบ

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง และตัวอย่างหอยนางรมหนาม

1. นำ standard domoic acid ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100, 1000 ng/ml ที่เตรียมไว้ใส่ 8-well microtiter plate หลุมละ 50 µl โดยให้ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2. ทำ blank โดยนำ Phosphate Buffer Saline (PBS)ใส่ 8-well microtiter plate หลุมละ 50 µl จำนวน 3 ซ้ำ

3. นำตัวอย่างสารละลายที่สกัดได้จากแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่าแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง และตัวอย่างหอยนางรมหนาม ใส่ 8-well microtiter plate หลุมละ 50 µl

4. ผสม anti-DA rabbit 6 µl กับ Phosphate Buffer Saline (PBS) 6 ml หลังจากนั้นนำสารละลาย anti-DA rabbit ที่ผสมเรียบร้อยแล้วใส่ 8-well microtiter plate ทุกหลุมๆละ 50 µl

5. ปิดผนึกด้วยพลาสติกใส แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1% Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBST) 2 ครั้ง

6. ผสม HRP-anti rabbit 11 µl กับ Phosphate Buffer Saline (PBS) 11 ml หลังจากนั้นนำสารละลาย HRP-anti rabbit ที่ผสมแล้วใส่ 8-well microtiter plate ทุกหลุมๆ ละ 100 µl

7. ปิดผนึกด้วยพลาสติกใส แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 40 นาที แล้วล้างด้วย 0.1% Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBST) 2 ครั้ง

8. ทำ Substrate solution โดยละลาย Sigma-Fast Gold tablet 1 เม็ด ลงในน้ำกลั่น 20 mlละลายให้เข้ากัน และใส่ Sigma - Fast silver tablet 1 เม็ด โดยไม่ต้องเขย่า สารละลาย Substrate solution ที่ผสมเรียบร้อยแล้วใส่ 8-well microtiter plate ทุกหลุมๆ ละ 100 µl

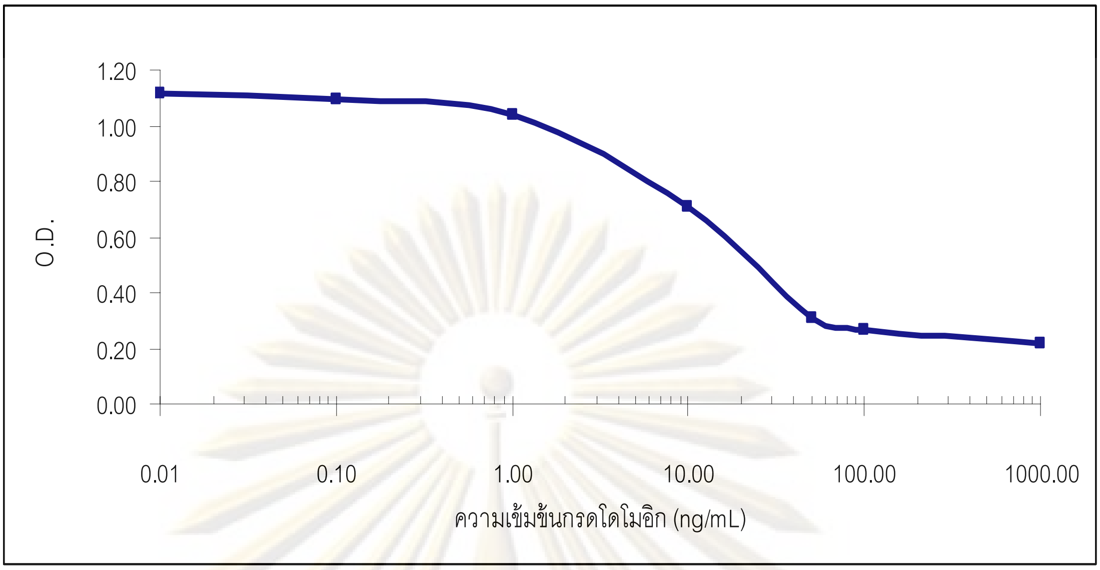
9. ปิดผนึกด้วยพลาสติกใส แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 10-15 นาที

10. ใส่สารละลาย Sulfuric (H_2SO_4) ความเข้มข้น 2N ใน 8-well microtiter plate ทุกหลุมๆ ละ 50 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาการเกิดสี และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 nm โดยใช้เครื่อง micro plate reader (รูปที่ 3.5)

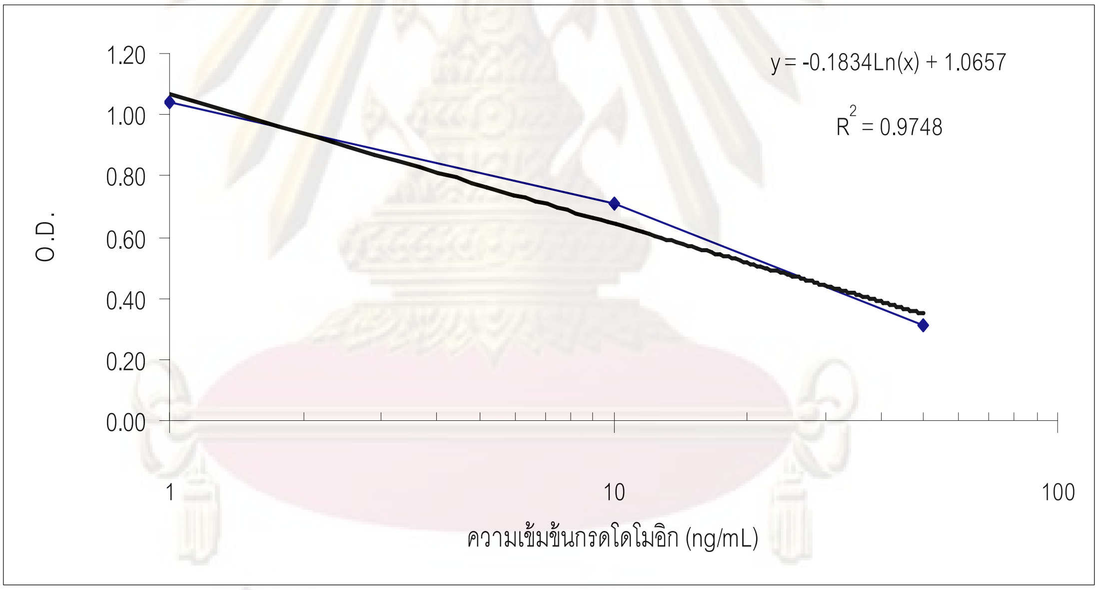
11. คำนวณปริมาณกรดโดโมอิกของตัวอย่างสารละลายที่สกัดได้จากแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง และตัวอย่างหอยนางรมหนาม โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm กับปริมาณกรดโดโมอิกของ standard ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100, 1000 ng/ml (รูปที่ 3.6) แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาแทนค่าลงในสมการเส้นตรง (รูปที่ 3.7)

รูปที่ 3.5 เครื่อง micro plate reader วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของกรดโดโมอิก



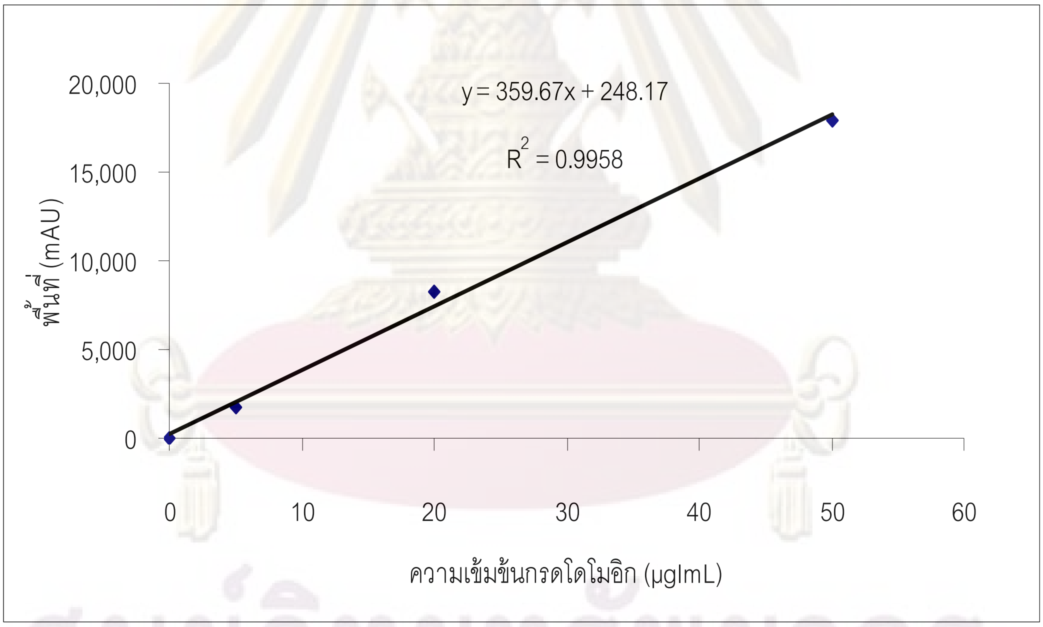
รูปที่ 3.7 สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นกรดโดโมอิกมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืช และตัวอย่างหอยนางรมหนาม โดยใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatrograph)

4.1 การคำนวณปริมาณกรดโดโมอิกจากสารละลายมาตรฐาน

1. นำสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 µg/ml ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatrograph) ปริมาณ 20 µl ขนาดของ column ยาว 150 mm กว้าง 2.1 mm บรรจุด้วย C18 ขนาดอนุภาค 3 µm จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่พีกของกรดโดโมอิกที่ความยาวคลื่น 242 nm กับความเข้มข้นกรดโดโมอิกมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20 และ 50 µg/ml (รูปที่ 3.8)
2. ใช้ mobile phase ที่ผสมด้วย Acetonitrile : Water : Formic acid (9 : 90.8 : 0.2)
3. ใช้เครื่องตรวจวัด UV, ความยาวคลื่นคงที่ 242 nm
4. ใช้อัตราการไหลของ mobile phase เท่ากับ 0.2 ml/min อุณหภูมิ 30 ^{0}C



รูปที่ 3.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่พีกของกรดโดโมอิกที่ความยาวคลื่นคงที่ 242 นาโนเมตร กับความเข้มข้นกรดโดโมอิกมาตรฐาน

4.2 การคำนวณปริมาณกรดโดโมอิกของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง และตัวอย่างหอยนางรมหนาม

1. นำตัวอย่างสารละลายที่สกัดได้จากแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่าแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง และตัวอย่างหอยนางรมหนามที่สกัดไว้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatrograph) และระบบของ HPLC ใช้แบบเดียวกับสารละลายมาตรฐานกรดโดโมอิก

2. นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างสารละลายที่สกัดได้จากแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง และตัวอย่างหอยนางรมหนามมาเทียบหาปริมาณกรดโดโมอิกโดยใช้กราฟกรดโดโมอิกมาตรฐาน (รูปที่ 3.8)

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณกรดโดโมอิกที่สะสมในอวัยวะส่วนต่างๆ ของหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* และตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลแต่ละฤดูกาลโดยเปรียบเทียบความแตกต่างใช้ One – way ANOVA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ Regression

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

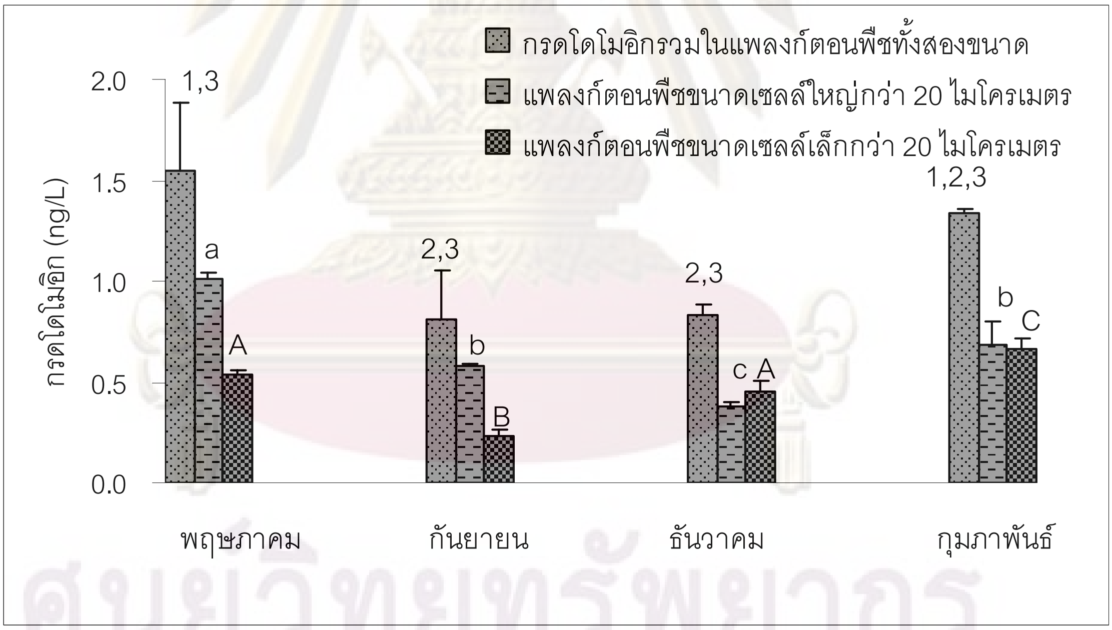
บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 การศึกษาปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยง ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA

ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล

การตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเลของสถานีที่ 1 พบว่ากรดโดโมอิกรวมในแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดมีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม โดยมีแนวโน้มลดต่ำลงในเดือนกันยายน และธันวาคม และเริ่มมีค่าสูงขึ้นในเดือกุมภาพันธ์ (รูปที่ 4.1)



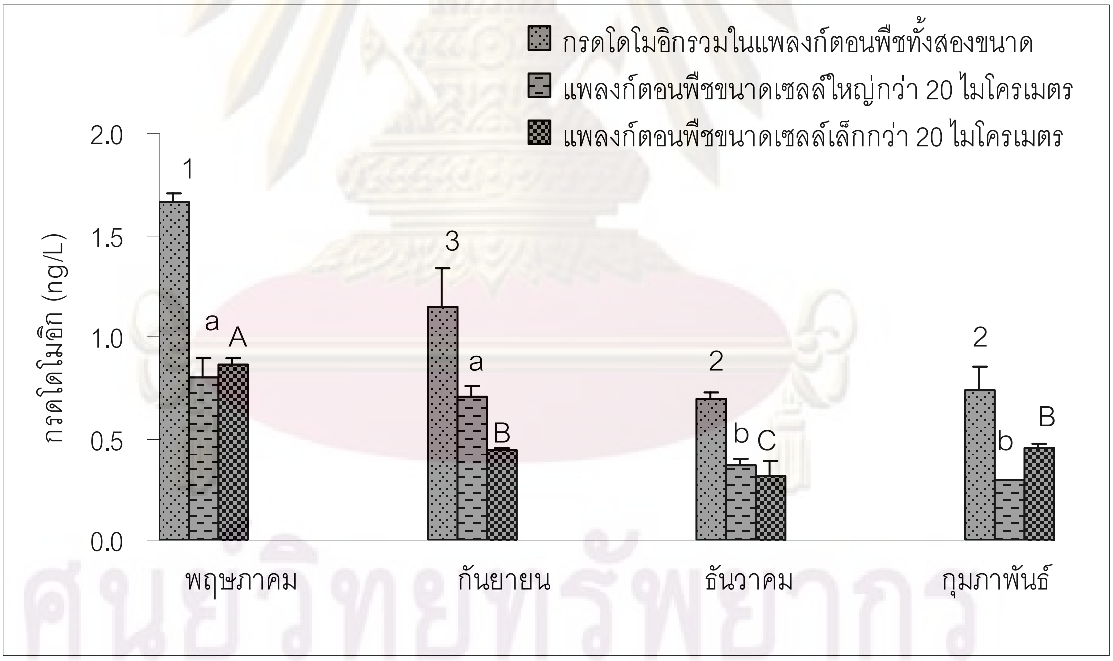
หมายเหตุ : 123, abc, ABC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

รูปที่ 4.1 กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเลบริเวณสถานี 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดโดโมอิกรวมในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดั 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล ในเดือนพฤษภาคมพบว่ามีความแตกต่างกับเดือนกันยายน และ ธันวาคม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 1) กรดโดโมอิกในเซลล์ขนาดใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และ กุมภาพันธ์ เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และเดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 2) และกรดโดโมอิกในเซลล์ขนาดเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน และ กุมภาพันธ์ เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ เดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 3)

สำหรับการตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเลของสถานีที่ 1 พบว่ากรดโดโมอิกรวมในแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดมีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม โดยมีแนวโน้มลดต่ำลงในเดือนกันยายน และธันวาคม และเริ่มมีค่สูงขึ้นในเดือนกุมภาพันธ์เช่นเดียวกับที่ผิวน้ำทะเล (รูปที่ 4.2)

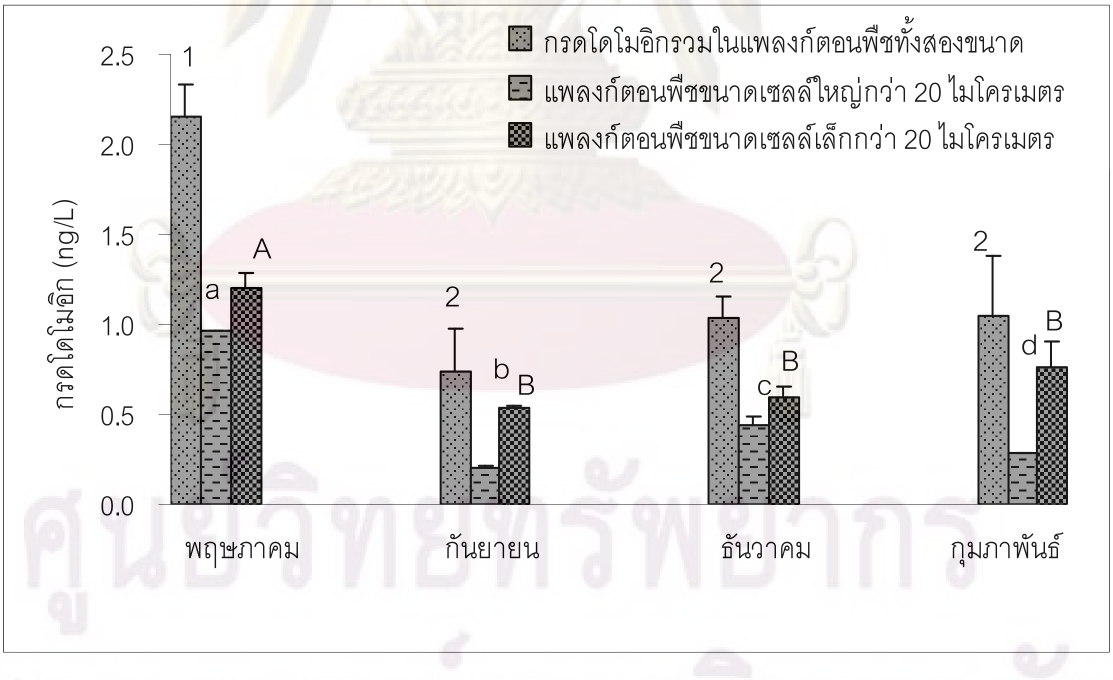


หมายเหตุ : 123, ab, ABC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

รูปที่ 4.2 กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 1

กรดโดโมอิกรวมในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดั 0.5 เมตรจากพื้นทะเล ในเดือนพฤษภาคมพบว่ามีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ กันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาคผนวกตารางที่ 4) กรดโดโมอิกในเซลล์ขนาดใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (ภาคผนวกตารางที่ 5) และกรดโดโมอิกในเซลล์ขนาดเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และเดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (ภาคผนวกตารางที่ 6)

สำหรับการตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเลของสถานีที่ 2 พบว่ากรดโดโมอิกรวมในแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดมีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม และมีแนวโน้มลดต่ำลงในเดือนถัดไป โดยมีค่าต่ำสุดในเดือนกันยายและมีค่าเพิ่มขึ้นในเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.3)

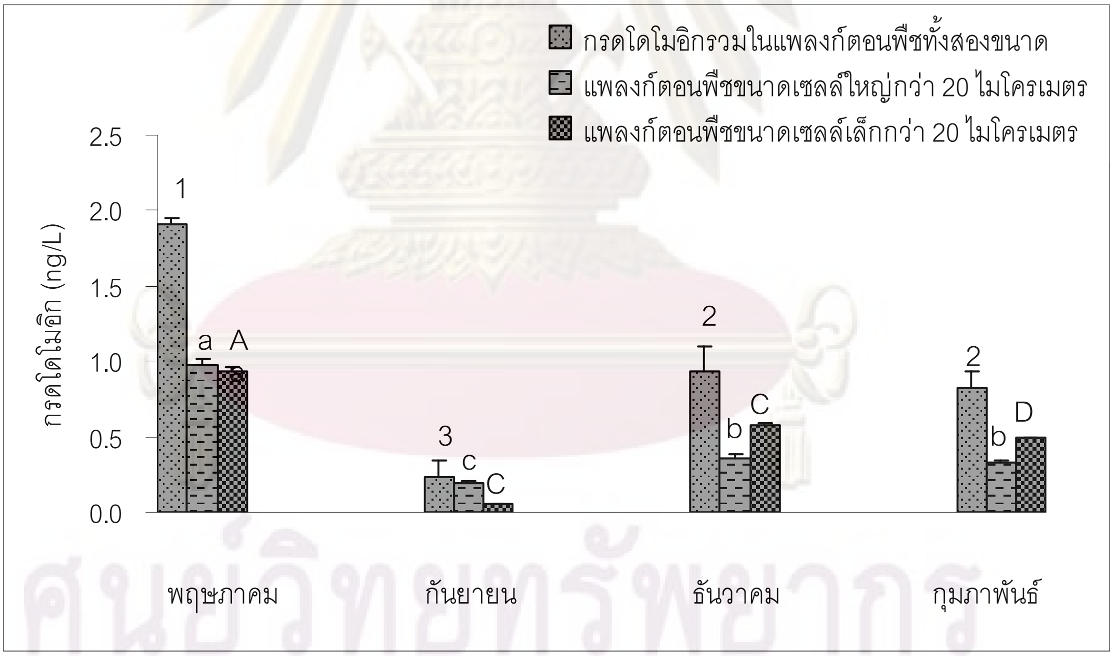


หมายเหตุ : 12, abcd, AB มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

รูปที่ 4.3 กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเลบริเวณสถานี 2

กรดโดโมอิกรวมในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดั 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล ในเดือนพฤษภาคมพบว่ามีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 7) กรดโดโมอิกในเซลล์ขนาดใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ เดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 8) และกรดโดโมอิกในเซลล์ขนาดเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 9)

สำหรับการตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเลของสถานีที่ 2 พบว่ากรดโดโมอิกรวมในแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดมีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม และมีแนวโน้มลดต่ำลงในเดือนถัดไป โดยมีค่าต่ำสุดในเดือนกันยา เช่นเดียวกับที่ผิวน้ำทะเล (รูปที่ 4.4)



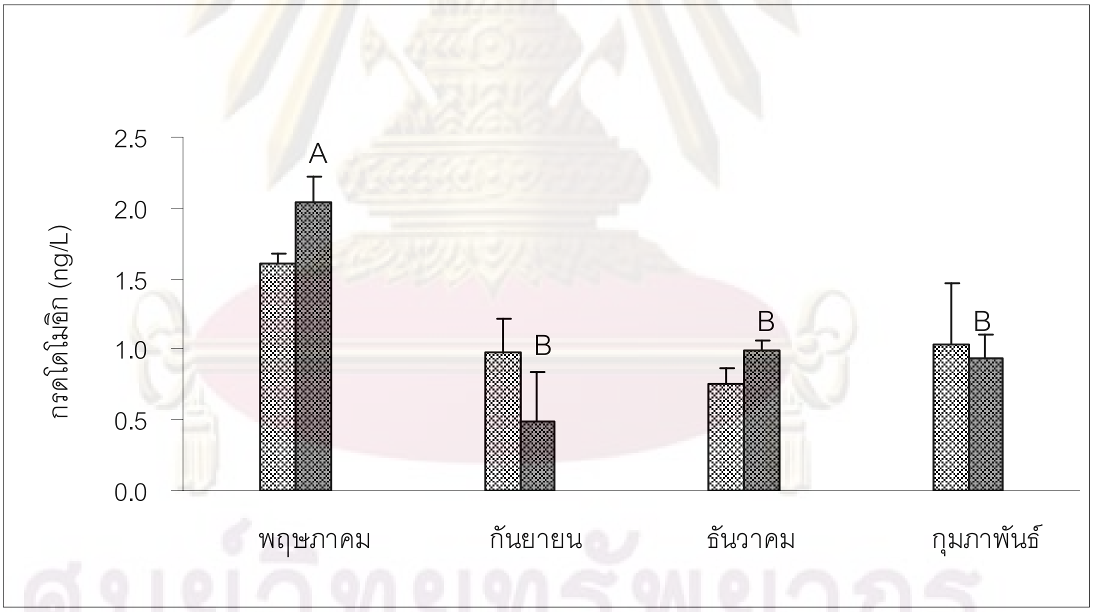
หมายเหตุ : 123, abc, ABCD มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

รูปที่ 4.4 กรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดโดโมอิกรวมในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดที่กรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดั 0.5 เมตรจากพื้นทะเล ในเดือนพฤษภาคมพบว่ามีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ กันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาคผนวกตารางที่ 10) กรดโดโมอิกในเซลล์ขนาดใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (ภาคผนวกตารางที่ 11) และกรดโดโมอิกในเซลล์ขนาดเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ เดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (ภาคผนวกตารางที่ 12)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลในสถานี 1 และสถานี 2 พบว่ามีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม และมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 4.5)



หมายเหตุ : AB มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

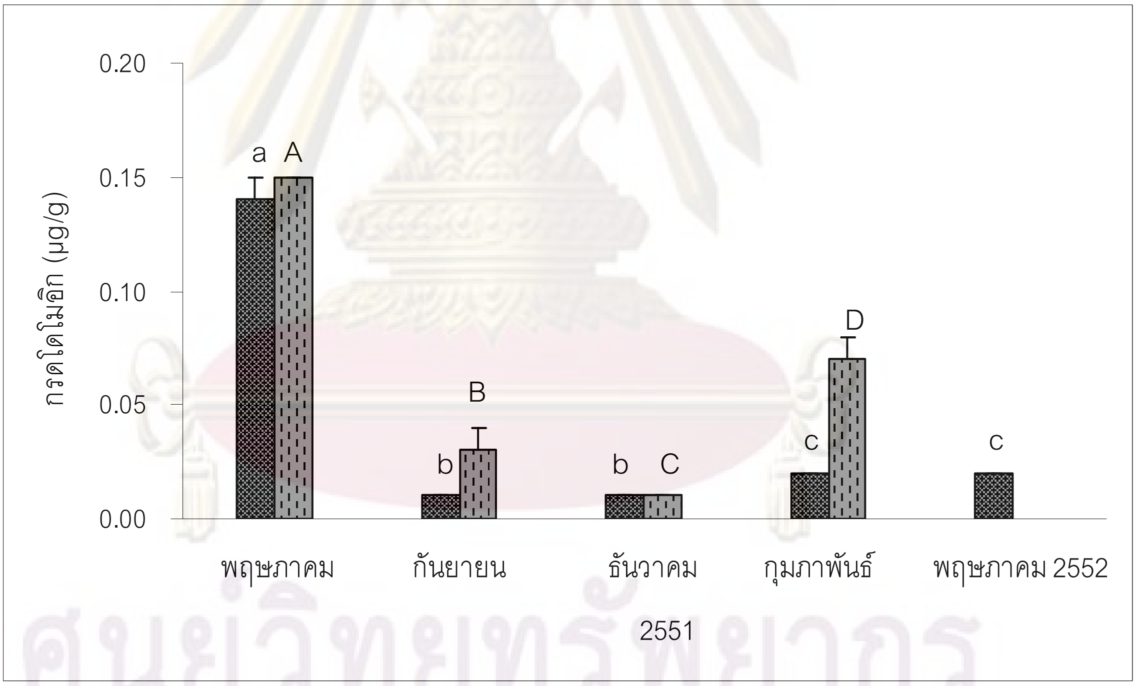
รูปที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1( ) และสถานี 2 ( )

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ของเดือพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ ในสถานี 1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 13) และค่าเฉลี่ยกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลในสถานี 2 ของเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 14)

ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor*

อวัยวะส่วน adductor muscle

การตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ adductor muscle ของหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* ในสถานี 1 และสถานี 2 พบว่ามีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม และมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดโดโมอิกคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 4.6)



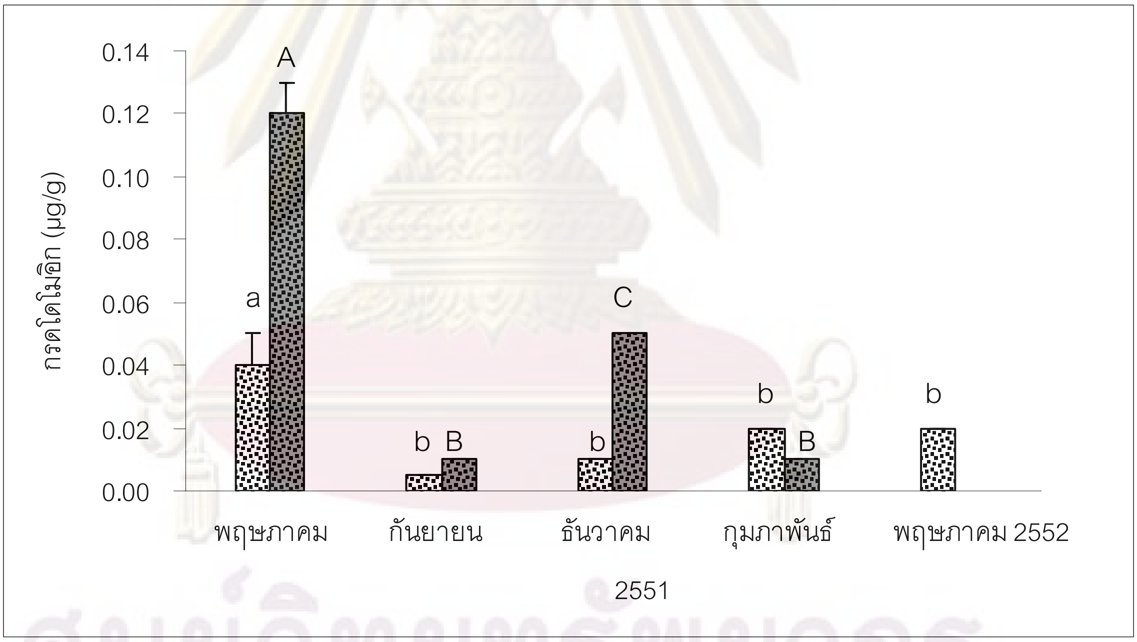
หมายเหตุ : abc, ABCD มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

รูปที่ 4.6 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ adductor muscle ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* ในเดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ 2551 และพฤษภาคม 2552 บริเวณสถานี 1 (▩) และสถานี 2 (▩)

โดยพบว่ากรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ adductor muscle ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* ของสถานี 1 ในเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ 2551 และพฤษภาคม 2552 เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ 2551 และพฤษภาคม 2552 เดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ 2551 และพฤษภาคม 2552 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาคผนวกตารางที่ 15) และสถานี 2 ในเดือนพฤษภาคมมีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ 2551 เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม และกุมภาพันธ์ 2551 เดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ 2551 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาคผนวกตารางที่ 16)

อวัยวะส่วน gonad

การตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ gonad ของหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* ในสถานี1 และสถานี 2 พบว่ามีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม (รูปที่ 4.7)



หมายเหตุ : ab, ABC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

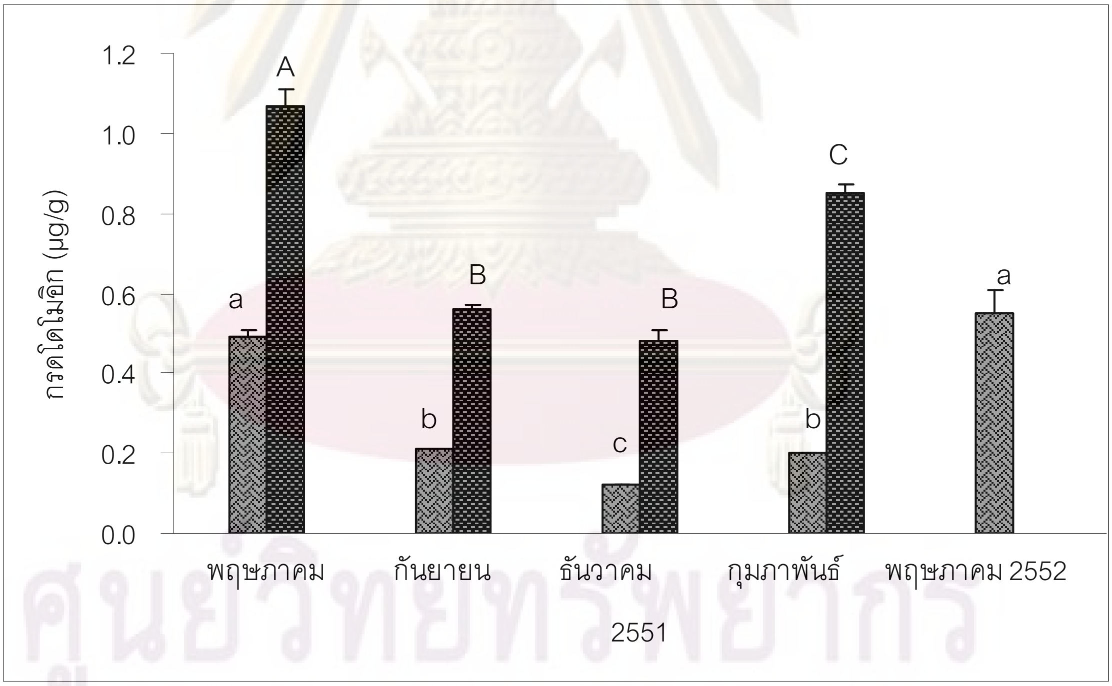
รูปที่ 4.7 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ gonad ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ 2551 และพฤษภาคม 2552 บริเวณสถานี1 ( ) และสถานี 2 ( )

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ gonad ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S. cf. versicolor* ในเดือนพฤษภาคมของสถานี 1 มีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ 2551 และพฤษภาคม 2552 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 17) และในเดือนพฤษภาคมของสถานี 2 มีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ 2551 เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม 2551 และเดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ 2551 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 18)

อวัยวะส่วน digestive gland

การตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ digestive gland ของหอยนางรมหนาม *S. cf. versicolor* ในสถานี 1 และสถานี 2 พบว่ามีค่ามากกว่าอวัยวะอื่นๆ และมีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดโดโมอิกใน digestive gland นี้มีรูปแบบคล้ายคลึงกันทั้งสองสถานี แต่ในสถานีที่ 2 มีปริมาณกรดโดโมอิกมากกว่าในสถานี 1 อย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 4.8)



หมายเหตุ : abc, ABC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

รูปที่ 4.8 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ digestive gland ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S. cf. versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ 2551 และพฤษภาคม 2552 บริเวณสถานี 1 ( ) และสถานี 2 ( )

ทั้งนี้พบว่ากรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ digestive gland ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคมในสถานี 1 มีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ 2551 เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนธันวาคม 2551 และพฤษภาคม 2552 เดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ 2551 และพฤษภาคม 2552 เดือนกุมภาพันธ์ 2551 มีความแตกต่างกับเดือนพฤษภาคม 2552 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 19) และเดือนพฤษภาคมของสถานี 2 มีความแตกต่างกับเดือนกันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ 2551 เดือนกันยายนมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ 2551 และเดือนธันวาคมมีความแตกต่างกับเดือนกุมภาพันธ์ 2551 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) (ภาคผนวกตารางที่ 20)

ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยง

ในเดือนพฤษภาคมได้ทำการแยกเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* sp. และ *Nitzschia* sp. สำเร็จจำนวน 2 clone คือ May-1 และ May-2 (รูปที่4.9) เดือนกันยายนทำการแยกเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* sp. และ *Nitzschia* sp. ได้สำเร็จจำนวน 4 clone คือ Sep-1, Sep-2, Sep-3 และ Sep-4 (รูปที่ 4.10 และ 4.11) เดือนธันวาคมทำการแยกเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* sp. ได้สำเร็จจำนวน 3 clone คือ Decem-1, Decem-2, และ Decem-3 (รูปที่ 4.12) และเดือนกุมภาพันธ์ทำการแยกเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* sp. และ *Nitzschia* sp. ได้สำเร็จจำนวน 5 clone คือ Feb-1, Feb-2, Feb-4, Feb-5 และ Feb-10 (รูปที่ 4.13) จากผลการตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิก พบว่าแต่ละ clone ในแต่ละเดือนที่ทำการแยกเลี้ยงมีปริมาณกรดโดโมอิกแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม clone ที่มีปริมาณกรดโดโมอิกสูงสุดพบในเดือนพฤษภาคมดังแสดงในรูป (4.14)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง

เดือนพฤษภาคม

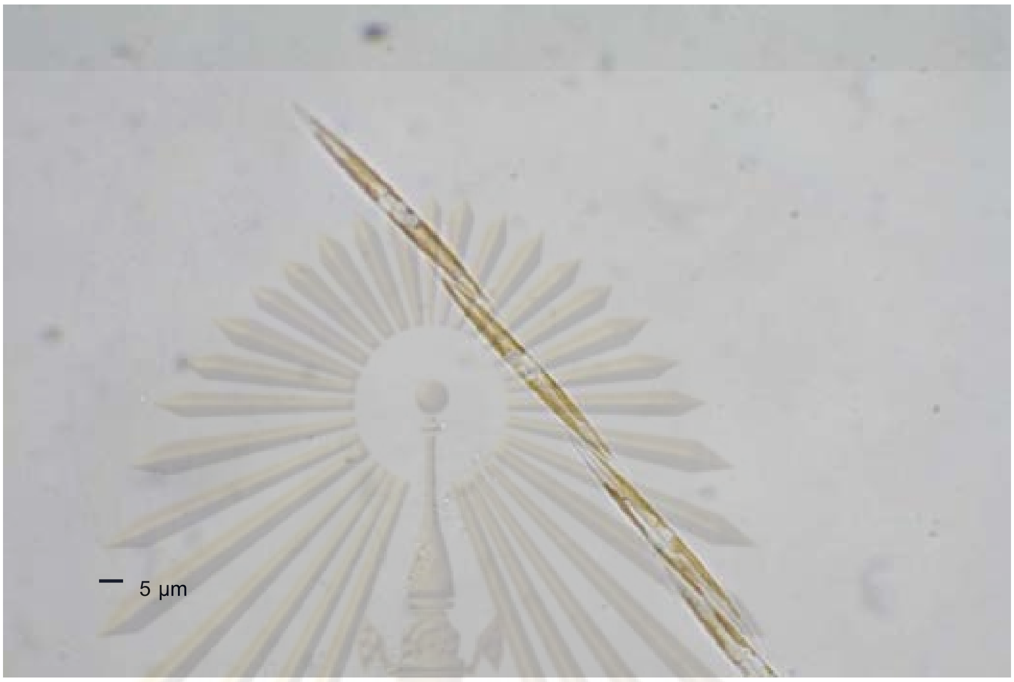
รูปที่ 4.9 ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนพฤษภาคม clone May-2 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร บริเวณสถานี 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือนกันยายน

รูปที่ 4.10 ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp. ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนกันยายน clone Sep-1 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 2

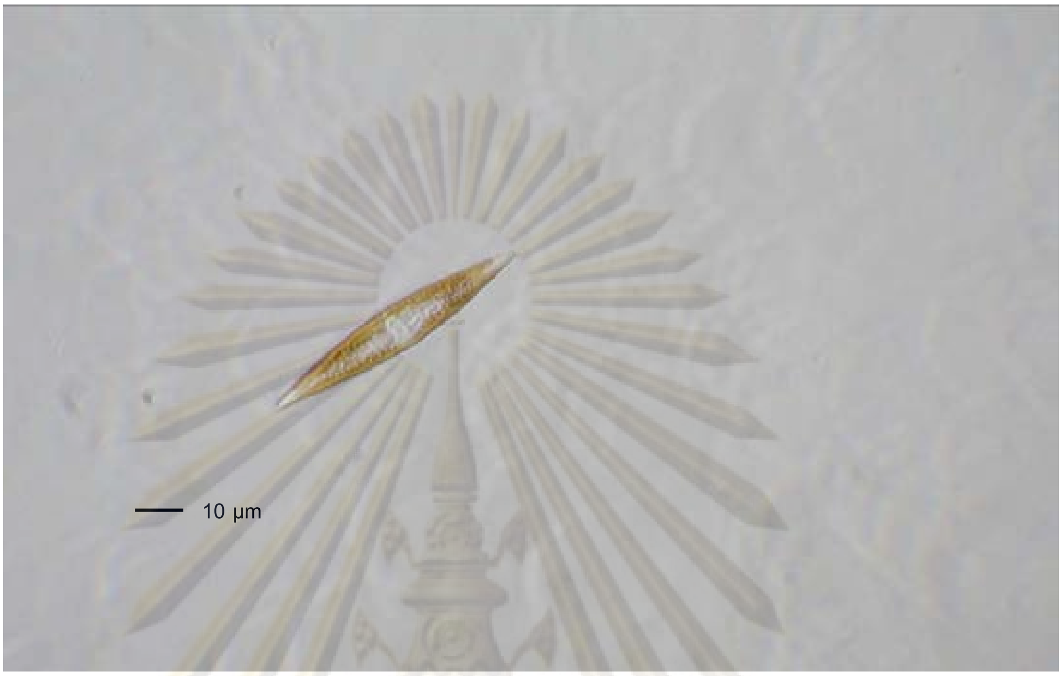
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11 ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนกันยายน clone Sep-2 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล บริเวสถานี 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือนธันวาคม

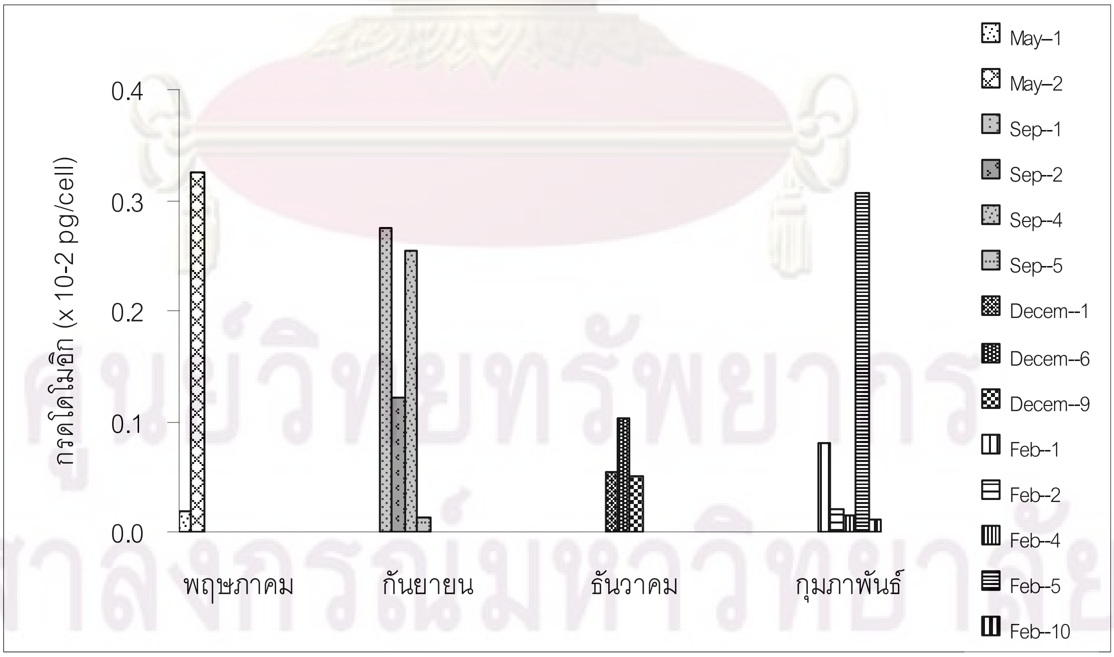


รูปที่ 4.12 ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp. ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนธันวาคม clone Decem-1 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือนกุมภาพันธ์

รูปที่ 4.13 ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร จากตัวอย่างเลี้ยงเดือนกุมภาพันธ์ clone Feb-5 ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล บริเวณสถานี 2

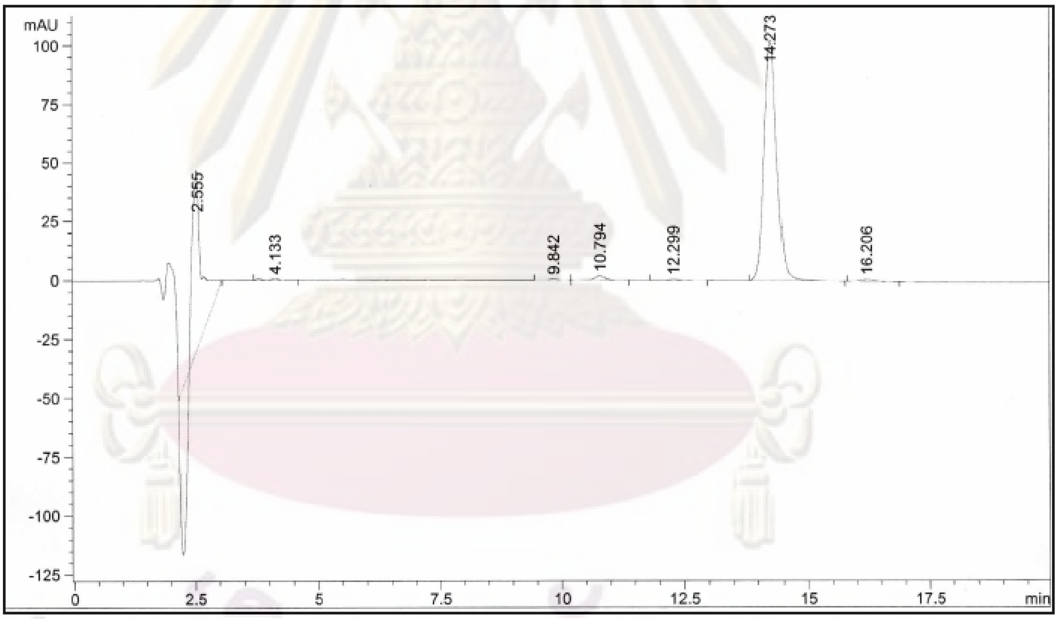


รูปที่ 4.14 ปริมาณกรดโดโมอิกของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 และสถานี 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

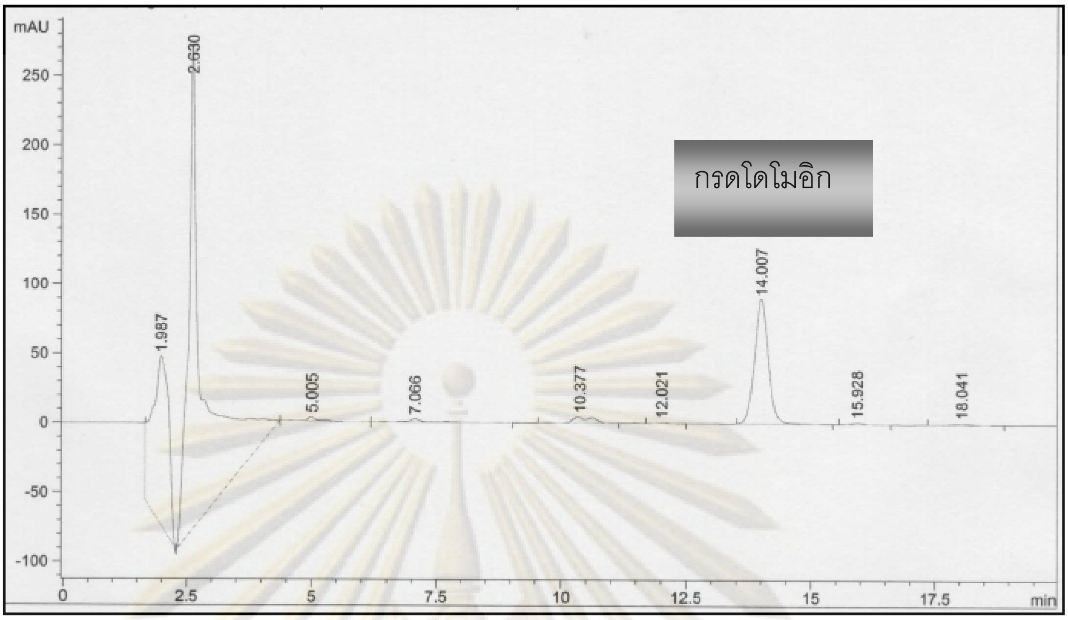
4.2 การวิเคราะห์กรดโดโมอิกในสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลตัวอย่างหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยง ด้วย HPLC

เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 14.27 นาที (รูปที่ 4.15) แต่การตรวจวิเคราะห์สารละลายที่สกัดจากตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง พบว่าไม่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในตัวอย่างทั้งหมด อย่างไรก็ตามทำการศึกษาเพิ่มเติมจากแพลงก์ตอนพืชที่แยกได้จากบริเวณอื่นๆ พบว่าแพลงก์ตอนพืชสกุล *Nitzschia* จากตัวอย่างเลี้ยง เดือนสิงหาคม ปี 2550 ที่แยกได้จากบริเวณป้อมพระจุล จังหวัดสมุทรปราการ สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในที่เวลา 14.00 นาที (รูปที่ 4.16) มีปริมาณกรดโดโมอิก 9.14 pg/cell (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดโดโมอิกความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมของกรดโดโมอิกในสารละลายตัวอย่างที่สกัดจากแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมสกุล *Nitzschia* ที่แยกลี้ยง ในเดือนสิงหาคม ปี 2550 บริเวณป้อมพระจุล จังหวัดสมุทรปราการ

รูปที่ 4.17 ลักษณะเซลล์แพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมสกุล *Nitzschia* ที่สามารถสร้างกรดโดโมอิกที่แยกได้จาก บริเวณป้อมพระจุล จังหวัดสมุทรปราการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล

จากการวิเคราะห์สมการเส้นถดถอยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนามของส่วนอวัยวะต่างๆ กับแพลงก์ตอนที่กรองแยกจากน้ำทะเลรวมทั้งสองขนาดบริเวณสถานี 1 และสถานี 2 (ตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2) พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกในหอยนางรมหนามของส่วนอวัยวะต่างๆ กับแพลงก์ตอนที่กรองแยกจากน้ำทะเลรวมทั้งสองขนาด

ตารางที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะหอยนางรมหนาม *s.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนที่กรองแยกจากน้ำทะเล บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี ที่ระดับนัยสำคัญ 95 %

อวัยวะส่วนต่างๆ	Y=X	R^2
กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ adductor muscle	(YA) = 0.092PT	0.610
กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ gonad	(YG) = 0.037PT	0.804
กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ digestive gland	(YD) = 0.461PT	0.884

หมายเหตุ : YA = กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ adductor muscle (µg/g)

YG = กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ gonad (µg/g)

YD = กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ digestive gland (µg/g)

PT = แพลงก์ตอนพืชขนาดเซลล์ใหญ่กว่าและเล็กกว่า 20 µm (ng/L)

การวิเคราะห์สมการแสดงความสัมพันธ์พบว่า ค่า intercept = 0 จึงเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ได้ Y=X

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะหอยนางรมหนาม *s.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนที่กรองแยกจากน้ำทะเล บริเวณสถานี 2 ที่ระดับนัยสำคัญ 95 %

อวัยวะส่วนต่างๆ	Y=X	R^2
กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ adductor muscle	(YA) = 0.118PT	0.830
กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ gonad	(YG) = 0.100PT	0.823
กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ digestive gland	(YD) = 1.128PT	0.869

หมายเหตุ : YA = กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ adductor muscle (μg/g)

YG = กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ gonad (μg/g)

YD = กรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ digestive gland (μg/g)

PT = แพลงก์ตอนพืชขนาดเซลล์ใหญ่กว่าและเล็กกว่า 20 μm (ng/L)

การวิเคราะห์สมการแสดงความสัมพันธ์พบว่า ค่า intercept = 0 จึงเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ได้ Y=X

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

5.1 การศึกษาปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยง ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA

จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 4 เดือนที่ทำการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชสามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาด คือ ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร และเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร โดยกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลเดือนพฤษภาคมมีปริมากรดโดโมอิกสูงสุดอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าแพลงก์ตอนพืชที่สามารถสร้างกรดโดโมอิกได้จะปะปนอยู่ในกลุ่มของแพลงก์ตอนพืชขนาดใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร และเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Ha et al. (2009) ที่ทำการศึกษากรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่มีขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร เท่านั้น

การศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนามมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล เป็นเส้นตรงไปในทิศทางเดียวกันเมื่อระดับระดับปริมาณกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลสูง จะส่งผลให้ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนามสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Ha et al. (2009) พบว่าปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S. versicolor* ที่ประเทศเวียดนามจะสัมพันธ์กับปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช คือ ปริมาณกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชสูงจะส่งผลให้ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนามสูงเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ากรดโดโมอิกสามารถถ่ายทอดผ่านห่วงโซ่อาหารจากแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอมไปสู่หอยนางรมหนามได้ จากการศึกษาของ Bates และ Trainer (2006) พบว่าหอยจะเป็นตัวการสำคัญในการถ่ายทอดกรดโดโมอิกผ่านห่วงโซ่อาหาร และยังมีสัตว์ทะเลอีกหลายชนิด เช่น กุ้ง โคพีพอต ปู ปลา และสัตว์หน้าดินต่างๆ สามารถถ่ายทอดกรดโดโมอิกผ่านห่วงโซ่อาหารได้เช่นกัน การศึกษาของ Huyen et al. (2006) พบว่าปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยแมลงภู่ *M. edulis* ที่ประเทศเวียดนามจะสัมพันธ์กับปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากน้ำทะเล และจาการศึกษาของ Bates et al. (1998) พบว่าปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่ประเทศแคนาดาจะสัมพันธ์กับปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่พบในน้ำทะเล ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยแมลงภู่จะแปรผันตามจำนวนเซลล์ของแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-*

nitzschia spp. และปริมาณกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชจะแปรผันตามจำนวนเซลล์ของแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. ด้วยเช่นกัน

การศึกษากรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง พบว่าในเดือนพฤษภาคม Clone May-2 มีปริมาณกรดโดโมอิกสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลในเดือนพฤษภาคม แสดงให้เห็นว่า Clone May-2 อาจจะเป็นแพลงก์ตอนพืชชนิดที่สำคัญในการสร้างกรดโดโมอิกของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลในเดือนพฤษภาคม การศึกษาปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่เลี้ยงของ Kotaki (2008) พบว่าถ้าระดับกรดโดโมอิกมีปริมาณมากกว่า 10 pg/cell จะจัดอยู่ในระดับกรดโดโมอิกสูงมาก ถ้าระดับกรดโดโมอิกมีปริมาณ 1 ถึง 10 pg/cell จะจัดอยู่ในระดับกรดโดโมอิกปานกลาง และถ้าระดับกรดโดโมอิกมีปริมาณน้อยกว่า 1 pg/cell จะจัดอยู่ในระดับกรดโดโมอิกต่ำมาก ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ Clone May-2 ของเดือนพฤษภาคม จะจัดอยู่ในระดับกรดโดโมอิกต่ำมาก อย่างไรก็ตามปริมาณกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชที่เลี้ยง อาจจะมีกาเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ทำการเลี้ยง การศึกษาของ Fehling (2004) พบว่าอุณหภูมิอาจจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อการสร้างกรดโดโมอิกได้เช่นกัน โดยพบว่าแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. ที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าภาวะปกติ จะมีการสร้างกรดโดโมอิกสูงกว่ปกติ เนื่องจากอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เกิดความเครียด จึงส่งผลต่อเซลล์แพลงก์ตอนพืช จากการศึกษาของ Fehling, et al. (2004b) พบว่าประเทศเดนมาร์กแพลงก์ตอนพืช *P. seriata* ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะสร้างกรดโดโมอิกได้สูงกว่าอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส อาจจะเป็นเพราะอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เกิดความเครียด จึงตอบสนองโดยการสร้างกรดโดโมอิกในปริมาณสูงกว่าที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของ Bates (1998) กล่าวว่าระดับกรดโดโมอิกในแพลงก์ตอนพืชเลี้ยง *Pseudo-nitzschia* spp. จะสร้างกรดโดโมอิกได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้เลี้ยง จากการศึกษาของ Fehling, et al. (2004a) พบว่าธาตุอาหารจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมทาบอลิซึม และการสร้างกรดโดโมอิกของแพลงก์ตอนพืช *P. seriata* และจากการศึกษาของ Bates and Richard (1995) พบว่าไดอะตอม *P. multiseries* ที่เลี้ยงในอาหารจะสร้างกรดโดโมอิกสูงมากในช่วงระยะเวลาที่มีปริมาณซิลิเกตจำกัดหรือระยะ stationary phase จากการศึกษาของ Fehling, et al. (2004a) พบว่าระยะ stationary phase จะสังเกตได้จากปริมาณซิลิเกตลดลงอย่างมาก ประกอบกับจำนวนเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชลดลงอย่างรวดเร็วขณะที่ธาตุซิลิเกตในอาหารหมด ธาตุซิลิเกตหมดจะทำให้ของเหลวภายในเซลล์ (plasma) แพลงก์ตอนพืชถูกทำลายและตายในที่สุด ไดอะตอมเมื่ออยู่ในสภาวะขาดธาตุอาหาร ทำให้ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ภายในเซลล์ของไดอะตอมถูกทำลาย และไดอะตอมมีความต้องการธาตุซิลิเกตสูงถึง 2 เท่า เพื่อใช้

ในการสร้างเปลือก และการสังเคราะห์ DNA และจากการศึกษาของ Bates et al. (1998) พบว่าปี 1987 ที่บริเวณ Cardigan Bay เกิดการสะพรั่งของแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. มีการสร้างกรดโดโมอิกในช่วงที่ความเข้มข้นของซิลิเกตลดลง แต่กลับพบว่าแพลงก์ตอนพืช *Pseudo-nitzschia* spp. ต้องการไนโตรเจนปริมาณมากเพื่อใช้ในการสร้างกรดโดโมอิก เพราะธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของกรดโดโมอิก และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Fehling, et al. (2004a) พบว่า *Pseudo-nitzschia* spp. จะต้องการธาตุไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสร้างกรดโดโมอิกเช่นเดียวกัน จากการศึกษาของ Bates et al. (1998) พบว่าแพลงก์ตอนพืช *P. multiseries* จะสร้างกรดโดโมอิกในช่วงที่ความเข้มข้นของซิลิเกตและฟอสเฟตลดลง

5.2 การวิเคราะห์กรดโดโมอิกในสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลตัวอย่างหอยนางรมหนาม *Spondylus* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืช *Pseudo - nitzschia* spp. และ *Nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยง ด้วย HPLC

การศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลตัวอย่างหอยนางรมหนาม และตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง ไม่สามารถตรวจพบพีกกรดโดโมอิกของตัวอย่างทั้งหมด เนื่องจากกรดโดโมอิกในตัวอย่างมีค่าความเข้มข้นต่ำจนไม่สามารตรวจพบ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Bates et al, (1988) พบว่าการใช้ HPLC ตรวจหากรดโดโมอิกในหอยแมลงภู่ที่มีค่าความเข้มข้นน้อยกว่า 1 μg/g จะไม่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกได้ ซึ่งระบบ HPLC ประกอบด้วย Column ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร ความกว้าง 2.1 เซนติเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร /นาที mobile phase ใช้ 10% acetonitrile 0.1 % trifluoroacetic acid เครื่องรุ่น HP 1090M และใช้ diode array detector (DAD) เครื่องตรวจวัดเป็น UV และความยาวคลื่นคงที่ 242 นาโนเมตร แต่จากการศึกษาของ Quilliam, et. al, (1989) พบว่าสามารถตรวจพบกรดโดโมอิกได้ในหน่วยระดับนาโนกรัม (ค่าต่ำสุดเครื่องตรวจพบคือ 0.3 นาโนกรัม) ของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช และตัวอย่างหอยแมลงภู่ โดยใช้ diode array detector (DAD), เครื่องตรวจวัดเป็น UV, ความยาวคลื่นคงที่ 242 นาโนเมตร และmobile phase ใช้ acetonitrile 0.1% ผสมกับ trifluoroacetic acid จากการศึกษาของ Kotaki et al, (2004) พบว่าที่ประเทศญี่ปุ่น และฟิลิปปินส์ค่าต่ำสุดของเครื่อ HPLC สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช *Nitzschia* spp.ที่มีค่าความเข้มข้น 0.3 ng/ml จากการศึกษาของ Australia New Zealand Food Authority, (2001) พบว่าการตรวจหากรดโดโมอิกด้วย HPLC ต้องนำตัวอย่างที่มีกรดโดโมอิกไปทำปฏิกิริยากับสาร 9-fluorenylmethyl chloroformate จึงได้ตัวอย่างกรดโดโมอิกอยู่ในรูป fluorenylmethoxycarbonyl

(FMOC) และใช้เครื่องตรวจวัดเป็น fluorescence สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในตัวอย่างน้ำทะเลที่มีค่าความเข้มข้น 15 pg/ml และในสัตว์ทะเลใช้เครื่องตรวจวัดเป็น UV สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกที่มีค่าความเข้มข้น 20-30 ng/g จากการศึกษาของ Garthwaite (2000) พบว่า HPLC ต่อกับ mass spectrometry สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในสัตว์ทะเลที่มีค่าความเข้มข้นต่ำสุด 10 ng/g จากการศึกษาของ Fehling (2004) ในการวิเคราะห์หากรดโดโมอิกด้วย HPLC โดยใช้ UV เป็นตัวตรวจวัด และใช้ diode array detection (DAD) พบว่าค่าต่ำสุดที่ตรวจพบกรดโดโมอิกได้ในตัวอย่างสัตว์น้ำมีค่าความเข้มข้น 1 µg/g และพบว่าการตรวจหากรดโดโมอิกได้จะขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด และการทำความสะอาดตัวอย่าง (cleanup) ก่อนที่จะวิเคราะห์หากรดโดโมอิก

ดังนั้นผลของการตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกด้วย HPLC ที่ไม่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกได้ในการศึกษาครั้งนี้ จึงอาจจะมีสาเหตุจากปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างมีค่าความเข้มข้นต่ำจนไม่สามารถตรวจพบได้ จึงควรจะเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่าง โดยการเพิ่มปริมาณน้ำทะเลที่ใช้กรองแพลงก์ตอนพืชให้มากขึ้น ส่วนตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชเลี้ยงควรจะมีการเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้น และตัวอย่างหอยนางรมหนามควรมีการเพิ่มจำนวนหอยนางรมรมหนามให้มากขึ้นเช่นเดียวกัน และควรใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์อื่นๆ เช่น ใช้ HPLC ต่อกับ mass spectrometry เพราะ mass spectrometry เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่สามารถนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร โดยอาศัยหลักการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็นไอออนด้วยการให้พลังงานที่มากพอจนทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวออกเป็นไอออน แล้วทำการแยกและตรวจสอบไอออนที่เกิดขึ้น และใช้สารในการวิเคราะห์น้อยมาก (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535) จากการศึกษาของ Takata et al, (2009) พบว่าสามารถตรวจพบกรดโดโมอิกเมื่อใช้ HPLC ต่อกับ mass spectrometry และจากการศึกษาของ Ha et al, (2009) พบว่าใช้เครื่อง HPLC ต่อกับ mass spectrometry สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชเช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกด้วย HPLC ในแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง เดือนสิงหาคม ปี 2550 บริเวณป้อมพระจุล จังหวัดสมุทรปราการ สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกมีปริมาณ 9.14 pg/cell แสดงให้เห็นว่าถ้าแพลงก์ตอนพืชที่สร้างกรดโดโมอิกได้ในปริมาณมากก็จะสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี HPLC นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่ามีแพลงก์ตอนพืชที่สามารถสร้างพิษได้ปริมาณสูงในอ่าวไทยตอนใน

5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาด มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ adductor muscle, gonad และ digestive gland ในทางบวก คือ ปริมาณแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีปริมาณกรดโดโมอิกในหอยนางรหนามเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ha et al. (2009) พบว่าปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนาม S. *versicolor* บริเวณ Nha Phu Bay ประเทศเวียดนาม มีความสัมพันธ์กับปริมาณแพลงก์ตอนพืชที่สร้างกรดโดโมอิก คือ ปริมาณแพลงก์ตอนพืชสูงจะส่งผลให้ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนามสูงเช่นเดียวกัน และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะของหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* และแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลทั้งสองสถานี ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการสะสมกรดโดโมอิกขอส่วนอวัยวะ digestive gland สูงสุด รองลงมาอวัยวะส่วน adductor muscle และอวัยวะส่วน gonad น้อยสุด ปริมาณกรดโดโมอิกที่พบมากใน digestive gland มีรายงานการตรวจพบในหอยสองฝาชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ปริมาณกรดโดโมอิกที่พบในอวัยวะส่วนต่างๆ ของหอยสองฝา

ผู้ศึกษา	สถานที่ศึกษา	อวัยวะส่วน	ปริมาณกรดโดโมอิก (µg/g)
Bates et al., 1988	ปี 1988 เดือนพฤศจิกายน บริเวณ Cardigan River ที่ Prince Edward Island ประเทศแคนาดา	digestive glandของ หอยแมลงภู่ *M. edulis*	1,535
Australia New Zealand Food Authority, 2001	ปี 1993 ชายฝั่งทะเล ประเทศนิวซีแลนด์	digestive gland ของ หอย scallop	600
Vale and Sampayo, 2001	ปี 2000 บริเวณ Lisbon ประเทศโปรตุเกส	digestive gland ของ หอยแมลงภู่	325
การศึกษาครั้งนี้	ปี 2008 พฤษภาคม เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย	digestive gland ของ หอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor*	1.07

ปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ adductor muscle, gonad และ digestive gland ของหอยนางรมหนาม บริเวณสถานี 2 สูงกว่าสถานี 1 เนื่องจากหอยนางรมหนามบริเวณสถานี 2 มีขนาดใหญ่กว่าสถานี 1 จากการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยหอยนางรมหนามบริเวณสถานี 1 และสถานี 2 มีขนาด 210.97± 65.64 และ 242.31± 47.18 กรัม (น้ำหนักเนื้อหอยทั้งตัว) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการศึกษาของ Rajesh et al. (2001) พบว่าหอยนางรม (*Crassostrea madrasensis*) หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) และหอย Yello clam (*Paphia malabarica*) ที่มีขนาดใหญ่จะมีอัตราการกรองกิน (Filtration rate) แพลงก์ตอนพืช *Isochrysis galbana* สูงกว่าหอยสองฝาที่มีขนาดเล็ก และพบว่าหอยนางรม *C. madrasensis* จะมีอัตราการกรองกินสูงกว่าหอยแมลงภู่ *P. viridis* และหอย *P. malabarica* ตามลำดับ ดังนั้นขนาดของหอยจึงอาจจะเป็นสาเหตุให้หอยนางรมหนามบริเวณสถานี 2 มีปริมาณกรดโดโมอิกสูงกว่าสถานี 1 และการศึกษาครั้งนี้ในเดือนพฤษภาคม บริเวณสถานี 1 พบปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ digestive gland, adductor muscle และ gonad 0.49 ± 0.02, 0.14 ± 0.01 และ 0.04 ± 0.01 µg/g ตามลำดับ และบริเวณสถานี 2 พบปริมาณกรดโดโมอิกของส่วนอวัยวะ digestive gland, adductor muscle และ gonad 1.07 ± 0.04, 0.15 ± 0.00 และ 0.12± 0.00 µg/g ตามลำดับ

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

1. แพลงก์ตอนพืชที่สร้างกรดโดโมอิกสามารถพบได้ในแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาด คือ แพลงก์ตอนพืชขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร และขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร แสดงให้เห็นว่าแพลงก์ตอนพืชทั้งสองขนาดอาจจะเป็นแหล่งของกรดโดโมอิกที่อาจจะสะสมในหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* และพบว่าปริมาณกรดโดโมอิกจากตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลในเดือนพฤษภาคม จะมีปริมาณกรดโดโมอิกสูงสุด

2. ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนาม พบว่าอวัยวะส่วน digestive gland มีการสะสมกรดโดโมอิกสูงสุด ดังนั้นในการรับประทานหอยนางรมหนามให้ปลอดภัยมากที่สุด ควรนำเอาอวัยวะส่วน digestive gland ออกก่อนจะรับประทาน และพบว่าในเดือนพฤษภาคม อวัยวะส่วน adductor muscle, gonad และ digestive gland ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม มีการสะสมกรดโดโมอิกสูงสุดเช่นเดียวกับปริมาณกรดโดโมอิกที่พบในแพลงก์ตอนพืช

3. ปริมาณกรดโดโมอิกที่พบในตัวอย่างหอยนางรมหนามจะแปรผันตามปริมาณกรดโดโมอิกที่พบในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล

4. การรับประทานหอยนางรมหนามอย่างปลอดภัย ไม่ควรจะรับประทานหอยนางรมหนามในเดือนพฤษภาคม เพราะมีปริมาณกรดโดโมอิกสูงสุด และการรับประทานหอยนางรมหนามควรรับประทานเฉพาะอวัยวะส่วน adductor muscle และ gonad แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกรดโดโมอิกที่ตรวจพบต่ำกว่าระดับควบคุม คือ 20 ไมโครกรัม/กรัม

5. ปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่ทำการเพาะเลี้ยง พบว่า Clone May-2 ของตัวอย่างเดือนพฤษภาคม มีปริมาณกรดโดโมอิกสูงสุด สอดคล้องกับปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล ซึ่งพบว่าเดือนพฤษภาคมมีปริมาณกรดโดโมอิสูงสุดเช่นเดียวกัน จึงอาจจะเป็นไปได้ว่า Clone May-2 เป็นชนิดที่สำคัญในการสร้างกรดโดโมอิกของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเลในเดือนพฤษภาคม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกด้วย HPLC ในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างหอยนางรมหนาม และตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยง พบว่าไม่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกในตัวอย่างทั้งหมดอาจจะมีสาเหตุจากปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างมีค่าความเข้มข้นต่ำจนไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีนี้

7. การตรวจวิเคราะห์กรดโดโมอิกด้วย HPLC ในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชชนิด *Nitzschia* spp. จากตัวอย่างเลี้ยงซึ่งแยกจากป่าชายเลน บริเวณป้อมพระจุล จังหวัดสมุทรปราการ ในเดือนสิงหาคม ปี 2550 พบว่ามีปริมาณกรดโดโมอิก 9.14 pg/cell แสดงให้เห็นว่ามีแพลงก์ตอนพืชที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่งอาจจะเป็นอันตรายได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการตรวจหาปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างหอยนางรมหนาม และหอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ ตลอดจนแพลงก์ตอนพืชทุกเดือนเพื่อให้ทราบแนวโน้มการสะสมกรดโดโมอิกที่ชัดเจน เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนการเตือนภัยและเรื่องความปลอดภัยในการบริโภคหอย

2. ควรมีการตรวจหาปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยงทุกวัน ตามระยะต่างๆ ของการเติบโต เพื่อให้ทราบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชเลี้ยงชัดเจนขึ้น

3. ควรมีการตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมอย่างละเอียด ได้แก่ ความลึก ความเค็ม อุณหภูมิ ออกซิเจนละลายน้ำ ความโปร่งแสง และความเป็นกรด-ด่าง ในแต่ละสถานีทุกครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อนำข้อมูลที่วัดได้ไปใช้ประโยชน์ในการอธิบายผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณพิษในแพลงก์ตอนพืชที่กรองแยกจากน้ำทะเล และควรมีการตรวจนับแพลงก์ตอนพืชชนิด *Pseudo - nitzschia* spp. จากน้ำทะเลเพื่อให้ทราบปริมาณแพลงก์ตอนพืชที่อาจเป็นพิษ

4. การศึกษาปริมาณกรดโดโมอิกจากตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ตัวอย่างหอยนางรมหนาม และตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างเลี้ยงด้วย HPLC (High Performance Liquid Chromatrograph) พบว่าไม่สามารถตรวจพบกรดโดโมอิกของตัวอย่างทั้งหมด จึงควรใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์อื่นๆ เช่น ใช้ HPLC ต่อกับ mass spectrometry (LC-MS) และควรหาวิธีกำจัดสิ่งรบกวนต่อการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่สะอาดมากพอต่อการวิเคราะห์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชลธยา ทรงรูป. 2541. สัณฐานวิทยาและการสร้างพิษของไดโนแฟลกเจลเลต สกุล *Alexandrium* บริเวณอ่าวไทยตอนบน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชลธยา ทรงรูป. 2546. การตรวจเฝ้าระวังแพลงก์ตอนพืชที่เป็นอันตรายต่อแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบริเวณชายฝั่ง กรณีศึกษา ณ สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล เกาะสีชัง. ใน การประชุมวิชาการทรัพยากรทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมทางน้ำเรื่องการจัดการมลภาวะชายฝั่งทะเแบบบูรณาการ, หน้า 143 - 150. 5 - 6 สิงหาคม 2546 ณ ห้องประชุมใหญ่ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม จังหวัดกรุงเทพมหานคร.

ธรณ์ ธำรงนาวาสวัสดิ์ และ สกลพรรณ ทิพานันท์. 2541. ทะเลไทย. 10000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร : จีโอโปรไฟล์.

นภาธร บานชื่น . 2530. ELISA : ทฤษฎีและปฏิบัติ. 500 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร : ศุภวนิชการพิมพ์.

ปนัดดา พัฒนวศิน. 2550. รงคเลขผิวบาง (Thin Layer Chromatography) การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. 500 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่1. ปทุมธานี : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ วิทยาเขตรังสิต.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2535. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

รวมทรัพย์ ชำนาญธนา. 2547. ความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนพืชที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีกับคุณภาพน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลบางขุนเทียน. ใน เอกสารวิชาการฉบับที่ 5, หน้า 1 - 32 ณ ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง จังหวัดกรุงเทพมหานคร.

รวมทรัพย์ ชำนาญธนา. 2549. แพลงก์ตอนพืชที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน. ใน เอกสารวิชาการฉบับที่1/2549, หน้า 1 - 89. ณ สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายแลน จังหวัดภูเก็ต.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2538. แพลงก์ตอนพืช. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาชีววิทยาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช. 1000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน. 2546ก. การศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อมและทรัพยากรชีวภาพเบื้องต้น บริเวณชายฝั่งทะเลบางขุนเทียน. ใน รายงานประจำปี, หน้า 1 - 61. ณ กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง จังหวัดกรุงเทพมหานคร.

ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน. 2546ข. การสำรวจเบื้องต้นระบบนิเวศน้ำกร่อยแม่น้ำบางปะกง. ใน รายงานประจำปี, หน้า 1 - 61. ณ กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง จังหวัดกรุงเทพมหานคร.

สมบัติ อินทร์คง และ อเนก โสภณ. 2548. สถานภาพทรัพยากรประมงเกาะสีชังจังหวัดชลบุรี. ใน การประชุมวิชาการคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 22 - 30. 20 - 22 มีนาคม 2548 ณ สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพมหานคร.

สมภพ รุ่งสุภา, ชลธยา ทรงรูป, อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์, อานุภาพ พานิชผล และ อเนก โสภณ. 2546. สถานการณ์การเกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีในประเทศไทย. ใน การตรวจเฝ้าระวังปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีในประเทศไทย, หน้า 74 – 104. ณ สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กรุงเทพมหานคร.

สุเมตต์ ปุจฉาการ, สุชา มั่นคงสมบูรณ์, ธิดารัตน์ น้อยรักษา และพิชัย สนแจ้ง. 2547. การศึกษาความหลากหลายของชนิดสัตว์ทะเลในแนวปะการังในภาคตะวันออกจังหวัดชลบุรี. ใน รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, หน้า 82 - 96. 5 - 6 สิงหาคม 2547 ณ หน่วยวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี.

สไบ กุศลส่ง และ วนิชชา ศรีบ้านดู่. 2547. การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเนื้อกุ้งเพื่อหาปริมาณสารตกค้างคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี HPLC-UV detector และ ELISA. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์. 2552. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและความชุกชุมของแพลงก์ตอนพืชที่อาจก่อให้เกิดอันตรายบริเวณชายฝั่ง จังหวัดสมุทรสาคร-สมุทรสงคราม. 300 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Amzil, Z.; Fresnel, J.; Gal, D. L. and Chantal, B. 2001. Domoic acid accumulation in French shellfish in relation totoxic species of *Pseudo- nitzschia multiseries* and *Pseudo- nitzschia pseudodelicatissima.* Toxicon. 39 : 1245-1251.

Australia New Zealand Food Authority. 2001. Shellfish toxins in food. Technical report series. 14 : 1- 21.

Bajarias, F. A., and others. 2006. Screening of diatoms producing. Coastal Marine Science. 30 (1) : 121-129.

Bargu, S.; Powell, C.L.; Wang, Z.; Doucette, G. J. and Mary, S. W. 2008. Note on the occurrence of *Pseudo-nitzschia australis* and domoic acid in squid from Monterey Bay, CA(USA). Harmful Algae. 7: 45-51.

Bates, S. 1998. Ecophysiology and Metabolism of ASP Toxin Production. Physiological ecology of harmful algal blooms. 405 - 426.

Bates, S.S., and others.1988. Investigations on the source of domoic acid responsible for the outbreak of amnesic shellfish poisoning (ASP) in eastern prince edward island. Atlantic research laboratory technical report 57 NRCC. 1-59.

Bates, S.; Garrison, D. and Horner , R. 1998. Bloom Dynamics and Physiology of Domoic - Acid- Producing *Pseudo-nitzschia* Species. Physiological ecology of harmful algal blooms. 267-292.

Bates, S. and Richard, J. 1995. Domoic acid production and cell division by *Pseudo-nitzschia multiseries* in relation to a light : dark cycle in silicate-limited chemostat culture. Harmful Marine Algae Blooms. 140-143.

Bates, S. and Trainer, V.L. 2006. The Ecology of Harmful Diatoms. Ecology of Harmful Algae. 189 : 81-93.

Busse, L. B., and others. 2006. Domoic acid in phytoplankton and fish in San Diego, CA,USA. Harmful Algae. 5 : 91-101.

Chan, O. M. 2006. Development of novel analytical techniques for the determination of shellfish poisoning toxins by solid-phase extraction and solid- phase microextraction. Department of Biology and Chemistry. In Partial of Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Philosophy.

Clayden, J.; Read,B. and Hebditch, K. 2005. Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. Tetrahedron. 61 : 5713–5724.

Dakin, W. J. 1928. The Anatomy and Phylogeny of Spondylus with a particular reference to the Lamellibranch Nervous System. Anatomy and Phylogeny of Spondylus. 337-354.

Dickey, R. W.; Fryxell, G. A.; Granade, H. R. and Daniel. 1992. Detection of the marine toxins okadaic acid anddomoic acid in shellfish and phytoplankton in the Gulf of Mexico. Toxicon. 30(3): 355-359.

Dizer, H. B.; Harabawy, A. S. A.; Hennion, M. C. and Hansen, P. D. 2001. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. Aquatic Toxicology. 55 : 149 -156.

FalK, M.; Seto, P. F. and John, A. W. 1991. Solubility of domoic acid in water and in non- aqueous solvents. Can. J. Chem. 69:1740-1744.

Fehling, J. 2004. Diversity, ecology and domoic acid production of *Pseudo-nitzschia* spp. in Scottish waters. Scottish Association for Marine Science. The Open University.

Fehling, J.; Davidson, K..; Bolch, C.J. and Bates, S.S. (2004a) Growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) under phosphate and silicate limitation. J. Phycol. 40 : 674-683.

Fehling, J.; Green, D.H.; Davidson, K.. ; Bolch, C.J. and Bates, S.S. (2004b). Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Scottish water. J. Phycol. 40 : 622-630.

Garthwaite, L. 2000. Keeping shellfish safe to eat : a brief review of shellfish toxins, and methods for their detection. Trends in food Science and Technology. 11: 253- 244.

Goldberg, J. D. 2003. Domoic acid in the benthic food web of Monterey Bay, California. The Faculty of California State University Monterey Bay. In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree. Master of Science in Marine Science.

Ha, D. V., and others. 2004. Domoic acid and paralytic shellfish toxins in a bivalve *Spondylus squamosus* collected from Nha Phu lagoon, Khanh Hoa Province Vietnam. The Fifth UNU/ORI International Workshop.

Ha, D. V.; Takata, Y.; Sato, S.; Fukuyo, Y. and Masaaki, K. 2006. Domoic acid in a bivalve *Spondylus cruentus* in Nha Trang Bay Khanh Hoa Province Vietnam. Coastal Marine Science. 30 (1) : 130 -132.

Ha D. V., and others. 2009. Seasonal variation of domoic acid in a bivalve *Spondylus versicolor* in association with that in plankton samples in Nha Phu Bay, Khanh Hoa, Vietnam. Food Science and Technology . 75 : 507–512.

Hess, P., and others. 2005. LC-UV and LC-MS methods for the Determination of domoic acid. Trends in Analytical Chemistry. 4 (24) : 358-367.

Hui, L., and others. 2007. Ingestion of Domoic acid and Its Impact on King Scallop (*Pecten maximus*, Linnaeus 1758). Journal of Ocean University of China. 6 (2) : 175-181.

Huyen, N. T. M., and others. 2006. Seasonal variation of paralytic and amnesic shellfish toxicities in bivalves and microalgae in Haiphong area, Vietnam. Coastal Marine Science. 30 (1) : 111-115.

James, K. J., and others. 2005. Amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve mollusks in Ireland. Toxicon. 46 : 852-858.

Jeffery, B.; Barlow, T.; Moizer, K.; Paul, S. and Boyle, C. 2004. Amnesic shellfish poison. Food and Chemical Toxicology. 42 : 545 -557.

Konosu, S.; Hashimoto, K., Onoue, Y. and Fusetani, N. 1979. Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Japan : Scientific societies press.

Kotaki, Y., and others.1999. Comfirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseries* isolated from Ofunato Bay, Japan. Toxicon. 37 : 677- 682.

Kotaki, Y., and others. 2004. Wide distribution of Nitzschia navis-varingica, a new domoic acid-producing benthic diatom found in Vietnam. Fisheries Science. 70 : 28-32.

Kotaki, Y. and others. 2005. Production of isodomoic acid A and B as major toxin components of a pinnate diatom *Nitzschia navis- Varingica*. Toxicon. 46 : 946 -953.

Kotaki, Y. 2008. Ecociology of Amnecic Sellfish Toxin producing Diatoms. Seafood and Freshwater Toxins : pharmacology, physiology. 383-395.

Lamprell, K. and Healy, K. 1998. Bivalves of Australia. Volume 2, Printed in the Netherlands : Backhuys Publishers Leiden The Netherlands.

Lefebvre, K. A.; Silver, M. W. and Coale, S. L. 2002. Domoic acid in planktivorous fish in relation to toxic *Pseudo-nitzschia* cell densities. Marine Biology. 140 : 625-631.

Lundholm,N. and Moestrup, J. 2000. Morphology of the marine diatom Nitzschia navis-varingica, sp.NOV.(Bacillariophyceae),another producer of the neurotoxin domoic acid. J.Phycol. 36 : 1162-1174.

Madhyastha, M. S., and others. 1991. In vitro study of domoic acid uptake by digestive gland tissue of blue mussle (*Mylilus edulis* L.). Aquatic Toxicology. 20 : 73 - 82.

Mos, L. 2001. Domoic acid : a fascinating marine toxin. Environmental Toxicology and Pharmacology. 9 : 79 - 85.

Ogata, T.; Kodama, M.; and Ishimaru, T. 1987. Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. Toxicon. 25 (9) : 923-928.

Paulay, G. 1995. New Records and Synonymies of Hawaiian Bivalves (Mollusca). Records of the Hawaii Biological Survey. 18 - 29.

Quilliam, M.A.; Sim, P.G., Mcculloch, A.W. and McInnes, A.G. 1989. High-Performance Liquid Chromatography of Domoic Acid, a Marine Neurotoxin, with Application to Shellfish and Plankton. International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 36 (3) : 139 – 154.

Rajesh, K.V.; Mohamed, K.S. and Kripa, V. 2001. Influence of algal cell concentration, salinity and body size on the filtration and ingestion rate of cultivable Indian bivalves. Indian Journal of Marine Science. 30 : 87-92.

Ravn, H. 1995. Amnesic Shellfish Poisoning. Manuals and Guides. 31(1) : 1-15.

Romero, M.L.J., and others. 2008. Isolation of ASP toxin-producing *Nitzschia* from thiland. Mar. Res. Indones. 33 (2) : 225–228.

Sournia, A.1995. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. In: Harmful Marine Algal Blooms. (Lassus, P. et al., eds), pp. 103-112. Paris, France : Lavoisier/Intercept.

Stonik, I. V.; Orlova,T.Y. and Shevchenko. 2001. Morphology and Ecology of the Species of the Genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) from Peter the Great Bay, Sea of Japan. Russian Journal of Marine Biology. 27 (6) : 362-366.

Takata, Y., and others. 2009. Occurrence of domoicacid in tropical bivalves. Fish Sci.75 : 473-480.

Trainer, V. L.; Adams, N. G.; Bill, B. D.; Stehr, C. M. and John, C. W. 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June1998. The American Society of Limnologyand Oceanography,Inc. 45 (8) : 1818-1833.

Vigilant, V. L. and Mary, W. S. 2007. Domoic acid in benthic flatfish on the continental shelf of Monterey Bay, California, USA. Mar Biol. 151: 2053– 2062.

Wright, J.L.C and Quilliam, M.A.1995. Methods for Domoic acid the Amnesic Shellfish Poisons Manual on harmful marine microalgae. Printed in France Unesco' s Workshops.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การเตรียม phosphate buffered saline (PBS)

1. ชั่งสาร NaCl 8 กรัม ความเข้มข้น 137 mM
2. ชั่งสาร Na_2HPO_4. anhydrous 1.1 กรัม ความเข้มข้น 8.10 mM
3. ชั่งสาร KCl ชั่ง 0.2 กรัม ความเข้มข้น 2.68 mM
4. ชั่งสาร KH_2PO_4 ชั่ง 0.2 กรัม ความเข้มข้น 1.47 mM

นำสารทั้งหมดผสมรวมกันแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และวัด pH เท่ากับ 7.4

2. การเตรียม Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBST)

ดูดสาร Tween-20 มา 1 มิลลิลิตร เติม phosphate buffered saline (PBS) ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3. ขั้นตอนการผ่าน Sep-Pak C18 cartridge สำหรับตัวอย่างหอยนางรมหนาม

1. เตรียม sorbent หรือ packing (C18) ที่บรรจุอยู่ในแท่ง Sep-Pak cartridge ให้พร้อมสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเติม 100% methanol 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และเติม 100% Acetic acid 5 มิลลิลิตร ลงใน Sep-Pak cartridge ตามลำดับ
2. เตรียมตัวอย่างหอยนางรมหนามโดยเติม Acetic acid วัด pH เท่ากับ 2 - 3
3. เติม 50% methanol 2 มิลลิลิตร ลงใน Sep-Pak cartridge เพื่อชะกรดโดโมอิกออกมาจาก Sep-Pak cartridge
4. นำตัวอย่างหอยนางรมหนามกรองผ่านกระดาษกรอง nylon membrane 0.45 ไมโครเมตร
5. นำตัวอย่างหอยนางรมหนามไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดโมอิกโดยใช้ HPLC

4. สูตรอาหารT_1 สำหรับเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช

ประกอบด้วย		ปริมาตร
1. $NaNo_3$	1.0 M	0.5 มิลลิลิตร/ลิตร
2. NaH_2Po_4	0.1 M	0.5 มิลลิลิตร/ลิตร
3. Fe-EDTA	5.0 mM	0.5 มิลลิลิตร/ลิตร
4. H_2SeO_3	0.01 mM	0.5 มิลลิลิตร/ลิตร
5. Na_2-EDTA	100 mM	1.0 มิลลิลิตร/ลิตร
6. Tris-HCl buffer	2.5 M	4.0 มิลลิลิตร/ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. Trace metal solution 0.5 มิลลิลิตร/ลิตร

8. Vitamin mixed solution 0.5 มิลลิลิตร/ลิตร

วิธีการเตรียม

1. $NaNo_3$ (1M)

ชั่งสาร 8.499 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. NaH_2Po_4 (0.1M)

ชั่งสาร 1.5601 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. Fe-EDTA (5 mM)

ทำเป็น stock 50 mMโดยจะต้องชั่งสาร 1.8351 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เวลาใช้ดูดจาก stock มา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย Volumetric flast จะได้ความเข้มข้น Fe-EDTA 5 mM

4. H_2SeO_3 (0.01mM)

ทำเป็น stock 100 mMโดยจะต้องชั่งสาร 1.2898 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เวลาใช้ดูดจาก stock 0.01 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย Volumetric flast จะได้ความเข้มข้น H_2SeO_3 0.01 mM

5. Na_2-EDTA (100 mM)

ชั่งสาร 3.7224กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

6. Tris-HCl buffer (2.5 mM)

ชั่งสาร 19.7 กรัม ละลายด้วยกรด HCl cone ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร วัด pH เท่ากับ 8.0

7. Trace metal solution

มีส่วนประกอบดังนี้

7.1 $ZnSo_4$	1.0 mM
7.2 $MnCl_2$	10 mM
7.3 $NaMoO_4$	0.5 mM
7.4 $CoCl_2$	0.2 mM
7.5 $CuSO_4$	0.01 mM
7.6 Na_2 EDTA	48 mM

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการเตรียม

สารตัวที่ 7.1-7.5 ต้องเตรียมเป็น stock แล้วจึง dilute ให้เป็นปริมาตรที่ต้องการ

7.1 $ZnSo_4$	1.0 mM	ชั่งสาร	2.8754 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
7.2 $MnCl_2$	10 mM	ชั่งสาร	13.8534 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร
7.3 $NaMoO_4$	50 mM	ชั่งสาร	1.2098 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
7.4 $CoCl_2$	20 mM	ชั่งสาร	0.4759 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
7.5 $CuSO_4$	10 mM	ชั่งสาร	0.2496 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
7.6 Na_2 EDTA	48 mM		

สารแต่ละตัวละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flast

การทำ Trace metal solution จะต้องเตรียม Na_2 EDTA 48 mM โดยการชั่งสาร 1.7868 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วดูดมา 50 มิลลิลิตร แล้วเติมด้วย stock solution ที่เตรียมไว้อย่างละ

7.1 $ZnSo_4$	1.0 มิลลิลิตร
7.2 $MnCl_2$	1.0 มิลลิลิตร
7.3 $NaMoO_4$	1.0 มิลลิลิตร
7.4 $CoCl_2$	1.0 มิลลิลิตร
7.5 $CuSO_4$	0.1 มิลลิลิตร

วัด pH เท่ากับ 10 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย Volumetric flast จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง GF/C

8. Vitamin mixed solution

มีส่วนประกอบดังนี้

1. Biotin	1 มิลลิกรัม/ลิตร
2. Vitamin B_{12}	1 มิลลิกรัม/ลิตร
3. Vitamin B_1	200 ไมโครกรัม/ลิตร

วิธีการเตรียม

1. Biotin Stock 100 มิลลิกรัม/ลิตร (0.1 กรัม/ลิตร) ชั่งสาร 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำกลั่ 100 มิลลิลิตร (0.01 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เวลาผสมนำมา 1 มิลลิลิตร

2. Vitamin B_{12} Stock 100 มิลลิกรัม/ลิตร (0.1 กรัม/ลิตร) ชั่งสาร 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (0.01 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เวลาผสมนำมา 1 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Vitamin B_1 ชั่งสาร 0.01 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เวลาผสมนำมา 0.2 มิลลิลิตร

การผสมทำดังนี้

Biotin Stock	1	มิลลิลิตร
Vitamin B_{12}	1	มิลลิลิตร
Vitamin B_1	0.2	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร วัด pH ให้ได้ 4 ด้วย HCl แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C

9. $Na_2SiO_3.H_2O$

ชั่งสาร $Na_2SiO_3.H_2O$ 1.65 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารสูตรT_1 จำนวน 2 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลรวมทั้งสองขนาด ที่ระดั 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One – way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)
พฤษภาคม	1.55±0.33
กันยายน	0.81±0.25
ธันวาคม	0.83±0.05
กุมภาพันธ์	1.34±0.01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.419	3	.140	4.521	.024
Within Groups	.371	12	.031		
Total	.790	15			

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.3725(*)	.12431	.011	.1017	.6433
	December	.3625(*)	.12431	.013	.0917	.6333
	Febuary	.1050	.12431	.415	-.1658	.3758
September	May	-.3725(*)	.12431	.011	-.6433	-.1017
	December	-.0100	.12431	.937	-.2808	.2608
	Febuary	-.2675	.12431	.052	-.5383	.0033
December	May	-.3625(*)	.12431	.013	-.6333	-.0917
	September	.0100	.12431	.937	-.2608	.2808
	Febuary	-.2575	.12431	.061	-.5283	.0133
Febuary	May	-.1050	.12431	.415	-.3758	.1658
	September	.2675	.12431	.052	-.0033	.5383
	December	.2575	.12431	.061	-.0133	.5283

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	1.01±0.03
กันยายน	0.58±0.01
ธันวาคม	0.38±0.02
กุมภาพันธ์	0.68±0.12

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.423	3	.141	32.206	.003
Within Groups	.018	4	.004		
Total	.440	7			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.4350(*)	.06614	.003	.2514	.6186
	December	.6350(*)	.06614	.001	.4514	.8186
	Febuary	.3300(*)	.06614	.008	.1464	.5136
September	May	-.4350(*)	.06614	.003	-.6186	-.2514
	December	.2000(*)	.06614	.039	.0164	.3836
	Febuary	-.1050	.06614	.188	-.2886	.0786
December	May	-.6350(*)	.06614	.001	-.8186	-.4514
	September	-.2000(*)	.06614	.039	-.3836	-.0164
	Febuary	-.3050(*)	.06614	.010	-.4886	-.1214
Febuary	May	-.3300(*)	.06614	.008	-.5136	-.1464
	September	.1050	.06614	.188	-.0786	.2886
	December	.3050(*)	.06614	.010	.1214	.4886

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 3 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล ขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร เดือน พฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	0.54±0.02
กันยายน	0.23±0.03
ธันวาคม	0.45±0.06
กุมภาพันธ์	0.66±0.06

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.198	3	.066	35.676	.002
Within Groups	.007	4	.002		
Total	.205	7			

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.3100(*)	.04301	.002	.1906	.4294
	December	.0900	.04301	.105	-.0294	.2094
	Febuary	-.1200(*)	.04301	.049	-.2394	-.0006
September	May	-.3100(*)	.04301	.002	-.4294	-.1906
	December	-.2200(*)	.04301	.007	-.3394	-.1006
	Febuary	-.4300(*)	.04301	.001	-.5494	-.3106
December	May	-.0900	.04301	.105	-.2094	.0294
	September	.2200(*)	.04301	.007	.1006	.3394
	Febuary	-.2100(*)	.04301	.008	-.3294	-.0906
February	May	.1200(*)	.04301	.049	.0006	.2394
	September	.4300(*)	.04301	.001	.3106	.5494
	December	.2100(*)	.04301	.008	.0906	.3294

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลรวมทั้งสองขนาด ที่ระดั 0.5 เมตรจากพื้นทะเล เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)
พฤษภาคม	1.66±0.04
กันยายน	1.15±0.19
ธันวาคม	0.69±0.04
กุมภาพันธ์	0.74±0.11

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.609	3	.203	19.894	.000
Within Groups	.122	12	.010		
Total	.731	15			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.2600(*)	.07142	.003	.1044	.4156
	December	.4850(*)	.07142	.000	.3294	.6406
	Febuary	.4625(*)	.07142	.000	.3069	.6181
September	May	-.2600(*)	.07142	.003	-.4156	-.1044
	December	.2250(*)	.07142	.008	.0694	.3806
	Febuary	.2025(*)	.07142	.015	.0469	.3581
December	May	-.4850(*)	.07142	.000	-.6406	-.3294
	September	-.2250(*)	.07142	.008	-.3806	-.0694
	Febuary	-.0225	.07142	.758	-.1781	.1331
Febuary	May	-.4625(*)	.07142	.000	-.6181	-.3069
	September	-.2025(*)	.07142	.015	-.3581	-.0469
	December	.0225	.07142	.758	-.1331	.1781

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 5 ปริมาณพิษในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)
พฤษภาคม	0.80±0.09
กันยายน	0.71±0.05
ธันวาคม	0.37±0.03
กุมภาพันธ์	0.29±0.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.381	3	.127	45.965	.001
Within Groups	.011	4	.003		
Total	.392	7			

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.0950	.05256	.145	-.0509	.2409
	December	.4350(*)	.05256	.001	.2891	.5809
	February	.5150(*)	.05256	.001	.3691	.6609
September	May	-.0950	.05256	.145	-.2409	.0509
	December	.3400(*)	.05256	.003	.1941	.4859
	February	.4200(*)	.05256	.001	.2741	.5659
December	May	-.4350(*)	.05256	.001	-.5809	-.2891
	September	-.3400(*)	.05256	.003	-.4859	-.1941
	February	.0800	.05256	.203	-.0659	.2259
February	May	-.5150(*)	.05256	.001	-.6609	-.3691
	September	-.4200(*)	.05256	.001	-.5659	-.2741
	December	-.0800	.05256	.203	-.2259	.0659

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ปริมาณพิษในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตร จาก พื้นทะเล ขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	0.86±0.03
กันยายน	0.44±0.01
ธันวาคม	0.32±0.07
กุมภาพันธ์	0.45±0.02

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.331	3	.110	86.654	.000
Within Groups	.005	4	.001		
Total	.337	7			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.4250(*)	.03571	.000	.3259	.5241
	December	.5350(*)	.03571	.000	.4359	.6341
	February	.4100(*)	.03571	.000	.3109	.5091
September	May	-.4250(*)	.03571	.000	-.5241	-.3259
	December	.1100(*)	.03571	.037	.0109	.2091
	February	-.0150	.03571	.696	-.1141	.0841
December	May	-.5350(*)	.03571	.000	-.6341	-.4359
	September	-.1100(*)	.03571	.037	-.2091	-.0109
	February	-.1250(*)	.03571	.025	-.2241	-.0259
February	May	-.4100(*)	.03571	.000	-.5091	-.3109
	September	.0150	.03571	.696	-.0841	.1141
	December	.1250(*)	.03571	.025	.0259	.2241

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 7 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลรวมทั้งสองขนาด ที่ระดั 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)
พฤษภาคม	2.16±0.17
กันยายน	0.74±0.24
ธันวาคม	1.04±0.11
กุมภาพันธ์	1.05±0.33

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.185	3	.395	10.675	.001
Within Groups	.444	12	.037		
Total	1.628	15			

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.7150(*)	.13600	.000	.4187	1.0113
	December	.5625(*)	.13600	.001	.2662	.8588
	Febuary	.5550(*)	.13600	.002	.2587	.8513
September	May	-.7150(*)	.13600	.000	-1.0113	-.4187
	December	-.1525	.13600	.284	-.4488	.1438
	Febuary	-.1600	.13600	.262	-.4563	.1363
December	May	-.5625(*)	.13600	.001	-.8588	-.2662
	September	.1525	.13600	.284	-.1438	.4488
	Febuary	-.0075	.13600	.957	-.3038	.2888
Febuary	May	-.5550(*)	.13600	.002	-.8513	-.2587
	September	.1600	.13600	.262	-.1363	.4563
	December	.0075	.13600	.957	-.2888	.3038

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	0.96±0.01
กันยายน	0.20±0.01
ธันวาคม	0.44±0.05
กุมภาพันธ์	0.29±0.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.708	3	.236	496.737	.000
Within Groups	.002	4	.000		
Total	.710	7			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.7700(*)	.02179	.000	.7095	.8305
	December	.5250(*)	.02179	.000	.4645	.5855
	February	.6750(*)	.02179	.000	.6145	.7355
September	May	-.7700(*)	.02179	.000	-.8305	-.7095
	December	-.2450(*)	.02179	.000	-.3055	-.1845
	February	-.0950(*)	.02179	.012	-.1555	-.0345
December	May	-.5250(*)	.02179	.000	-.5855	-.4645
	September	.2450(*)	.02179	.000	.1845	.3055
	February	.1500(*)	.02179	.002	.0895	.2105
February	May	-.6750(*)	.02179	.000	-.7355	-.6145
	September	.0950(*)	.02179	.012	.0345	.1555
	December	-.1500(*)	.02179	.002	-.2105	-.0895

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 9 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากผิวน้ำทะเล ขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	1.20±0.08
กันยายน	0.54±0.01
ธันวาคม	0.60±0.05
กุมภาพันธ์	0.76±0.14

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.533	3	.178	24.898	.005
Within Groups	.029	4	.007		
Total	.562	7			

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.6600(*)	.08448	.001	.4254	.8946
	December	.6000(*)	.08448	.002	.3654	.8346
	February	.4350(*)	.08448	.007	.2004	.6696
September	May	-.6600(*)	.08448	.001	-.8946	-.4254
	December	-.0600	.08448	.517	-.2946	.1746
	February	-.2250	.08448	.056	-.4596	.0096
December	May	-.6000(*)	.08448	.002	-.8346	-.3654
	September	.0600	.08448	.517	-.1746	.2946
	February	-.1650	.08448	.123	-.3996	.0696
February	May	-.4350(*)	.08448	.007	-.6696	-.2004
	September	.2250	.08448	.056	-.0096	.4596
	December	.1650	.08448	.123	-.0696	.3996

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเลรวมทั้งสองขนาด ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	1.91±0.04
กันยายน	0.24±0.10
ธันวาคม	0.94±0.16
กุมภาพันธ์	0.82±0.11

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.424	3	.475	59.732	.000
Within Groups	.095	12	.008		
Total	1.519	15			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.8300(*)	.06303	.000	.6927	.9673
	December	.4875(*)	.06303	.000	.3502	.6248
	Febuary	.5425(*)	.06303	.000	.4052	.6798
September	May	-.8300(*)	.06303	.000	-.9673	-.6927
	December	-.3425(*)	.06303	.000	-.4798	-.2052
	Febuary	-.2875(*)	.06303	.001	-.4248	-.1502
December	May	-.4875(*)	.06303	.000	-.6248	-.3502
	September	.3425(*)	.06303	.000	.2052	.4798
	Febuary	.0550	.06303	.400	-.0823	.1923
Febuary	May	-.5425(*)	.06303	.000	-.6798	-.4052
	September	.2875(*)	.06303	.001	.1502	.4248
	December	-.0550	.06303	.400	-.1923	.0823

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 11 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล ขนาดเซลล์ใหญ่กว่า 20 ไมโครเมตร เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	0.98±0.03
กันยายน	0.19±0.02
ธันวาคม	0.36±0.03
กุมภาพันธ์	0.33±0.01

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.732	3	.244	464.794	.000
Within Groups	.002	4	.001		
Total	.734	7			

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.7850(*)	.02291	.000	.7214	.8486
	December	.6200(*)	.02291	.000	.5564	.6836
	February	.6450(*)	.02291	.000	.5814	.7086
September	May	-.7850(*)	.02291	.000	-.8486	-.7214
	December	-.1650(*)	.02291	.002	-.2286	-.1014
	February	-.1400(*)	.02291	.004	-.2036	-.0764
December	May	-.6200(*)	.02291	.000	-.6836	-.5564
	September	.1650(*)	.02291	.002	.1014	.2286
	February	.0250	.02291	.337	-.0386	.0886
February	May	-.6450(*)	.02291	.000	-.7086	-.5814
	September	.1400(*)	.02291	.004	.0764	.2036
	December	-.0250	.02291	.337	-.0886	.0386

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 กรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล ที่ระดับ 0.5 เมตรจากพื้นทะเล ขนาดเซลล์เล็กกว่า 20 ไมโครเมตร เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	0.93±0.03
กันยายน	0.05±0.01
ธันวาคม	0.58±0.01
กุมภาพันธ์	0.49±0.01

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.776	3	.259	1149.704	.000
Within Groups	.001	4	.000		
Total	.777	7			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.8750(*)	.01500	.000	.8334	.9166
	December	.3550(*)	.01500	.000	.3134	.3966
	February	.4400(*)	.01500	.000	.3984	.4816
September	May	-.8750(*)	.01500	.000	-.9166	-.8334
	December	-.5200(*)	.01500	.000	-.5616	-.4784
	February	-.4350(*)	.01500	.000	-.4766	-.3934
December	May	-.3550(*)	.01500	.000	-.3966	-.3134
	September	.5200(*)	.01500	.000	.4784	.5616
	February	.0850(*)	.01500	.005	.0434	.1266
February	May	-.4400(*)	.01500	.000	-.4816	-.3984
	September	.4350(*)	.01500	.000	.3934	.4766
	December	-.0850(*)	.01500	.005	-.1266	-.0434

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล เดือน พฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)
พฤษภาคม	1.61±0.08
กันยายน	0.98±0.24
ธันวาคม	0.76±0.10
กุมภาพันธ์	1.04±0.42

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.777	3	.259	4.085	.104
Within Groups	.254	4	.063		
Total	1.031	7			

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยกรดโดโมอิกในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกรองแยกจากน้ำทะเล เดือน พฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (นาโนกรัม/ลิตร)**
พฤษภาคม	2.04±0.18
กันยายน	0.49±0.35
ธันวาคม	0.99±0.07
กุมภาพันธ์	0.94±0.16

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.570	3	.857	18.256	.008
Within Groups	.188	4	.047		
Total	2.758	7			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	1.5450(*)	.21662	.002	.9436	2.1464
	December	1.0450(*)	.21662	.008	.4436	1.6464
	February	1.1000(*)	.21662	.007	.4986	1.7014
September	May	-1.5450(*)	.21662	.002	-2.1464	-.9436
	December	-.5000	.21662	.082	-1.1014	.1014
	February	-.4450	.21662	.109	-1.0464	.1564
December	May	-1.0450(*)	.21662	.008	-1.6464	-.4436
	September	.5000	.21662	.082	-.1014	1.1014
	February	.0550	.21662	.812	-.5464	.6564
February	May	-1.1000(*)	.21662	.007	-1.7014	-.4986
	September	.4450	.21662	.109	-.1564	1.0464
	December	-.0550	.21662	.812	-.6564	.5464

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่15 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ adductor muscle ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ และพฤษภาคม 52 บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	ปริมาณพิษ (ไมโครกรัม/กรัม)
พฤษภาคม	0.14±0.01
กันยายน	0.01±0.00
ธันวาคม	0.01±0.00
กุมภาพันธ์	0.02±0.00
พฤษภาคม 52	0.02±0.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.023	4	.006	581.000	.000
Within Groups	.000	5	.000		
Total	.023	9			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.1250(*)	.00316	.000	.1169	.1331
	December	.1250(*)	.00316	.000	.1169	.1331
	Febuary	.1150(*)	.00316	.000	.1069	.1231
	May 2009	.1150(*)	.00316	.000	.1069	.1231
September	May	-.1250(*)	.00316	.000	-.1331	-.1169
	December	.0000	.00316	1.000	-.0081	.0081
	Febuary	-.0100(*)	.00316	.025	-.0181	-.0019
	May 2009	-.0100(*)	.00316	.025	-.0181	-.0019
December	May	-.1250(*)	.00316	.000	-.1331	-.1169
	September	.0000	.00316	1.000	-.0081	.0081
	Febuary	-.0100(*)	.00316	.025	-.0181	-.0019
	May 2009	-.0100(*)	.00316	.025	-.0181	-.0019
Febuary	May	-.1150(*)	.00316	.000	-.1231	-.1069
	September	.0100(*)	.00316	.025	.0019	.0181
	December	.0100(*)	.00316	.025	.0019	.0181
	May 2009	.0000	.00316	1.000	-.0081	.0081
May 2009	May	-.1150(*)	.00316	.000	-.1231	-.1069
	September	.0100(*)	.00316	.025	.0019	.0181
	December	.0100(*)	.00316	.025	.0019	.0181
	Febuary	.0000	.00316	1.000	-.0081	.0081

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ adductor muscle ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (ไมโครกรัม/กรัม)**
พฤษภาคม	0.15±0.00
กันยายน	0.03±0.01
ธันวาคม	0.01±0.00
กุมภาพันธ์	0.07±0.01

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.021	3	.007	92.000	.000
Within Groups	.000	4	.000		
Total	.021	7			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.1100(*)	.00866	.000	.0860	.1340
	December	.1350(*)	.00866	.000	.1110	.1590
	February	.0750(*)	.00866	.001	.0510	.0990
September	May	-.1100(*)	.00866	.000	-.1340	-.0860
	December	.0250(*)	.00866	.045	.0010	.0490
	February	-.0350(*)	.00866	.016	-.0590	-.0110
December	May	-.1350(*)	.00866	.000	-.1590	-.1110
	September	-.0250(*)	.00866	.045	-.0490	-.0010
	February	-.0600(*)	.00866	.002	-.0840	-.0360
February	May	-.0750(*)	.00866	.001	-.0990	-.0510
	September	.0350(*)	.00866	.016	.0110	.0590
	December	.0600(*)	.00866	.002	.0360	.0840

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ gonad ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ และพฤษภาคม 52 บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	ปริมาณพิษ (ไมโครกรัม/กรัม)
พฤษภาคม	0.04±0.01
กันยายน	0.01±0.00
ธันวาคม	0.01±0.00
กุมภาพันธ์	0.02±0.00
พฤษภาคม 52	0.02±0.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	7.500	.024
Within Groups	.000	5	.000		
Total	.001	9			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.0300(*)	.00632	.005	.0137	.0463
	December	.0300(*)	.00632	.005	.0137	.0463
	Febuary	.0200(*)	.00632	.025	.0037	.0363
	May 2009	.0200(*)	.00632	.025	.0037	.0363
September	May	-.0300(*)	.00632	.005	-.0463	-.0137
	December	.0000	.00632	1.000	-.0163	.0163
	Febuary	-.0100	.00632	.175	-.0263	.0063
	May 2009	-.0100	.00632	.175	-.0263	.0063
December	May	-.0300(*)	.00632	.005	-.0463	-.0137
	September	.0000	.00632	1.000	-.0163	.0163
	Febuary	-.0100	.00632	.175	-.0263	.0063
	May 2009	-.0100	.00632	.175	-.0263	.0063
Febuary	May	-.0200(*)	.00632	.025	-.0363	-.0037
	September	.0100	.00632	.175	-.0063	.0263
	December	.0100	.00632	.175	-.0063	.0263
	May 2009	.0000	.00632	1.000	-.0163	.0163
May 2009	May	-.0200(*)	.00632	.025	-.0363	-.0037
	September	.0100	.00632	.175	-.0063	.0263
	December	.0100	.00632	.175	-.0063	.0263
	Febuary	.0000	.00632	1.000	-.0163	.0163

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ gonad ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (ไมโครกรัม/กรัม)**
พฤษภาคม	0.12±0.01
กันยายน	0.01±0.00
ธันวาคม	0.05±0.00
กุมภาพันธ์	0.01±0.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.019	3	.006	128.000	.000
Within Groups	.000	4	.000		
Total	.019	7			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.1200(*)	.00707	.000	.1004	.1396
	December	.0800(*)	.00707	.000	.0604	.0996
	February	.1200(*)	.00707	.000	.1004	.1396
September	May	-.1200(*)	.00707	.000	-.1396	-.1004
	December	-.0400(*)	.00707	.005	-.0596	-.0204
	February	.0000	.00707	1.000	-.0196	.0196
December	May	-.0800(*)	.00707	.000	-.0996	-.0604
	September	.0400(*)	.00707	.005	.0204	.0596
	February	.0400(*)	.00707	.005	.0204	.0596
February	May	-.1200(*)	.00707	.000	-.1396	-.1004
	September	.0000	.00707	1.000	-.0196	.0196
	December	-.0400(*)	.00707	.005	-.0596	-.0204

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ digestive gland ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม กุมภาพันธ์ และพฤษภาคม 52 บริเวณสถานี 1 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	**ปริมาณพิษ (ไมโครกรัม/กรัม)**
พฤษภาคม	0.49±0.02
กันยายน	0.21±0.00
ธันวาคม	0.12±0.00
กุมภาพันธ์	0.20±0.00
พฤษภาคม 52	0.55±0.06

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.288	4	.072	80.017	.000
Within Groups	.004	5	.001		
Total	.293	9			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.2750(*)	.03000	.000	.1979	.3521
	December	.3650(*)	.03000	.000	.2879	.4421
	Febuary	.2850(*)	.03000	.000	.2079	.3621
	May 2009	-.0600	.03000	.102	-.1371	.0171
September	May	-.2750(*)	.03000	.000	-.3521	-.1979
	December	.0900(*)	.03000	.030	.0129	.1671
	Febuary	.0100	.03000	.752	-.0671	.0871
	May 2009	-.3350(*)	.03000	.000	-.4121	-.2579
December	May	-.3650(*)	.03000	.000	-.4421	-.2879
	September	-.0900(*)	.03000	.030	-.1671	-.0129
	Febuary	-.0800(*)	.03000	.045	-.1571	-.0029
	May 2009	-.4250(*)	.03000	.000	-.5021	-.3479
Febuary	May	-.2850(*)	.03000	.000	-.3621	-.2079
	September	-.0100	.03000	.752	-.0871	.0671
	December	.0800(*)	.03000	.045	.0029	.1571
	May 2009	-.3450(*)	.03000	.000	-.4221	-.2679
May 2009	May	.0600	.03000	.102	-.0171	.1371
	September	.3350(*)	.03000	.000	.2579	.4121
	December	.4250(*)	.03000	.000	.3479	.5021
	Febuary	.3450(*)	.03000	.000	.2679	.4221

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 กรดโดโมอิกในส่วนอวัยวะ digestive gland ของตัวอย่างหอยนางรมหนาม *S.* cf. *versicolor* เดือนพฤษภาคม กันยายน ธันวาคม และกุมภาพันธ์ บริเวณสถานี 2 เกาะขามใหญ่ จังหวัดชลบุรี และทดสอบทางสถิติด้วย One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD

เดือน	ปริมาณพิษ (ไมโครกรัม/กรัม)
พฤษภาคม	1.07±0.04
กันยายน	0.56±0.01
ธันวาคม	0.48±0.03
กุมภาพันธ์	0.85±0.02

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.443	3	.148	190.731	.000
Within Groups	.003	4	.001		
Total	.447	7			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiple Comparisons

LSD

(I) MONTH	(J) MONTH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
May	September	.5150(*)	.02784	.000	.4377	.5923
	December	.5900(*)	.02784	.000	.5127	.6673
	February	.2250(*)	.02784	.001	.1477	.3023
September	May	-.5150(*)	.02784	.000	-.5923	-.4377
	December	.0750	.02784	.054	-.0023	.1523
	February	-.2900(*)	.02784	.000	-.3673	-.2127
December	May	-.5900(*)	.02784	.000	-.6673	-.5127
	September	-.0750	.02784	.054	-.1523	.0023
	February	-.3650(*)	.02784	.000	-.4423	-.2877
February	May	-.2250(*)	.02784	.001	-.3023	-.1477
	September	.2900(*)	.02784	.000	.2127	.3673
	December	.3650(*)	.02784	.000	.2877	.4423

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิพวรรณ ยอดยิ่ง ภูมิลำเนา จังหวัดตรัง จบการศึกษาระดับมัธยมโรงเรียนห้วยยอด อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง จบปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล เมื่อปีการศึกษา 2549 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550 ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย และศูนย์ความเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย