โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และเทคนิคฟลูออโรเมทรี

Comparison of methods used for chlorophyll *a* determination: spectrophotometry and fluorometry

ชื่อนิสิต นางสาววรัทยา จันทร **เลขประจำตัว** 6032826023

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรี

นางสาววรัทยา จันทร

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Comparison of methods used for chlorophyll *a* determination: spectrophotometry and fluorometry

Miss Warattaya Juntorn

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Bachelor of Science in Marine Science
Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2020

หัวข้อโครงการ	การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรี
โดย	นางสาววรัทยา จันทร
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการหลัก	อาจารย์ ดร. สุธาพร บุญญเจตน์พงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2309499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

(ศาสตราจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

สุธาพร บุญญเจตน์พงษ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานหลัก

(อาจารย์ ดร. สุธาพร บุญญเจตน์พงษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชนา ชวนิชย์)

ปัทมา สิงหรักษ์

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา สิงหรักษ์)

สมฤดี จิตประไพ

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมฤดี จิตประไพ)

Project Title	Comparison of methods used for chlorophyll *a* determination: spectrophotometry and fluorometry
By	Warattaya Juntorn
Field of study	Marine Science
Advisor	Sutaporn Bunyajetpong, Ph.D.
Co-advisor	Assoc. Prof. Thaithawon Lirdwitayaprasit, Ph.D.

Accepted by the Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the bachelor's degree

..... Head of Marine Science Department

(Prof. Voranop Viyakarn, Ph.D.)

PROJECT COMMITTEE

.....Project Advisor

(Sutaporn Bunyajetpong, Ph.D.)

.....Project Co-advisor

(Assoc. Prof. Thaithawon Lirdwitayaprasit, Ph.D.)

.....Member

(Assoc. Prof. Suchana Chavanich, Ph.D.)

.....Member

(Asst. Prof. Patama Singhruck, Ph.D.)

.....Member

(Asst. Prof. Somrudee Jitpraphai, Ph.D.)

ชื่อโครงการ	การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรี
ชื่อนิสิต	นางสาววรัทยา จันทร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. สุธาพร บุญญเจตน์พงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ
ปีการศึกษา	2563
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll *a*) เป็นรงควัตถุในคลอโรพลาสท์ที่พบในแพลงก์ตอนพืชทุกชนิด ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล โดยมีบทบาทสำคัญเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง คลอโรฟิลล์เอทำหน้าที่หลักในการกักเก็บแสง และการแปลงพลังงานโฟตอนที่ดูดซับไปเป็นพลังงานเคมี การศึกษานี้ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรี โดยใช้สารมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอ แพลงก์ตอนพืชชนิด *Chattonella subsalsa* ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ที่มีอายุเซลล์ต่างกัน เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างที่มีทั้งคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์เอที่สลายตัว (phaeopigment) และตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเป็นตัวแทนของน้ำตัวอย่างในธรรมชาติ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ จากกราฟมาตรฐานและการคำนวณจากสูตรคำนวณต่างๆ ของ (1) เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ซึ่งประกอบด้วยหกสมการ คือ สมการที่ 1-3 ของ Parsons and Strickland (1963) สมการที่ 4 ของ Arnon (1949) สมการที่ 5 ของ Axler and Owen (1994) และสมการที่ 6 ของ Lorenzen (1967) และ (2) เทคนิคฟลูออโรเมทรีหนึ่งสมการ คือ สมการของ Knap *et al*. (1996) จากการทดลองพบว่า การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอจากกราฟมาตรฐานและสมการต่างๆ ของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ทุกวิธีมีค่าคลาดเคลื่อนทางบวก เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของเทคนิคฟลูออโรเมทรี นอกจากนั้นยังพบว่า เมื่อเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 432 และ 664 นาโนเมตร พบว่า ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร มีความชันที่ใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานของเทคนิคฟลูออโรเมทรีมากกว่าความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร นอกจากนี้ หากไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอจากกราฟมาตรฐานด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรีและเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ผู้วิจัยขอแนะนำให้วิเคราะห์ค่าโดยใช้สูตร UNESCO (Stickland & Parsons, 1963) ของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เพราะให้ค่าที่ใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานของเทคนิคฟลูออโรเมทรี โดยมีความคลาดเคลื่อนทางบวก 55 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: คลอโรฟิลล์เอ สเปกโตรโฟโตเมทรี ฟลูออโรเมทรี

Project Title Comparison of methods used for chlorophyll *a* determination: spectrophotometry and fluorometry
Name Miss Warattaya Juntorn
Advisor Sutaporn Bunyajetpong, PhD
Co-advisor Assoc. Prof. Thaithawon Lirdwitayaprasit, PhD
Academic Year 2020
Department Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

Abstract

Chlorophyll *a* (Chl *a*) is a pigment which can be found in phytoplankton's chloroplasts. It is important for photosynthesis; it captures light energy and converts light energy into chemical energy. This study aims to compare the methods used for Chl *a* determination by using spectrophotometry and fluorimetry. The phytoplankton culture *Chattonella subsalsa*, aseptic clonal culture with different ages, and the pond water around Chulalongkorn University were represented the Chl *a* and phaeopigment in laboratory and field samples, respectively. The Chl *a* was analyzed based on standard curves and various equations; (1) the equations of spectrophotometric technique were three equations from Parsons and Strickland, 1963, a equation from Arnon, 1949, a equation from Axler and Owen, 1994, and a equation from Lorenzen, 1967 and (2) the equation of fluorometric technique was a equation from Knap et al., 1996. All methods of spectrophotometric technique had shown positive tolerances, compared to the standard curve of fluorometric technique. For the standard curves of spectrophotometric technique, the slope of wavelength 432 nm was closer to the standard curve of fluorometric technique than it of wavelength 664 nm. Furthermore, if Chl *a* content could not be analyzed from the standard curve of fluorometric technique and the methods using high performance liquid chromatography (HPLC), the UNESCO equation (Stickland & Parsons, 1963) was recommended because the Chl *a* content was close to it analyzed from the standard curve of fluorometric technique with a positive discrepancy of 55%.

Keyword: chlorophyll *a,* fluorometry, spectrophotometry

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้ดำเนินการอย่างสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. สุธาพร บุญญเจตน์พงษ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำการวางแผนการเก็บตัวอย่าง และตรวจสอบแก้ไขโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากร ที่ให้การอนุเคราะห์ผู้วิจัยในการเรียนรู้เครื่องมือ ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ขอขอบคุณ คุณปรีชา เสนสิทธิ์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือ แนะนำการใช้เครื่องมือและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ ครอบครัว เพื่อน พี่ น้อง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และคนใกล้ชิดทุกท่าน ที่ให้กำลังใจ รวมทั้งช่วยเหลือในการทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ครั้งนี้สำเร็จไปได้อย่างดี

วรัทยา จันทร

สิงหาคม 2564

สารบัญ

บทคัดย่อ ..... ก

Abstract ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญรูป ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการศึกษา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ 2

1.3 ขอบเขตการศึกษา 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและการศึกษาที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ความสำคัญของคลอโรฟิลล์เอ 3

2.2 แพลงก์ตอนพืช 3

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ 4

บทที่ 3 วิธีการศึกษา 8

3.1 การเตรียมการปฏิบัติการ 8

3.2 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี 9

3.3 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคฟลูออโรเมทรี 10

3.4 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช 11

3.5 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 12

บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล 14

4.1 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี 14

4.2 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคฟลูออโรเมทรี 15

4.3 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เทียบกับเทคนิคฟลูออโรเมทรี 17

4.4 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช 18

4.5 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 20

บทที่ 5 สรุปผลศึกษาและข้อเสนอแนะ 22

5.1 สรุปผลการศึกษา 22

5.2 ข้อเสนอแนะ 22

เอกสารอ้างอิง 23

ภาคผนวก 25

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แพลงก์ตอนพืชชนิด *Chattonella* sp. 4

2.2 คิวเวทท์ควอร์ตซ์ analytikjena 10 มิลลิเมตร 5

2.3 คิวเวทท์ควอร์ตซ์ SCC 10 มิลลิเมตร 6

3.1 สารมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอ 9 ความเข้มข้น 8

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลล์เอ 9

3.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 10

3.4 เครื่องฟลูออโรมิเตอร์ 11

3.5.1 บ่อน้ำบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 13

3.5.2 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 13

3.5.3 กระดาษกรองน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 13

4.1 กราฟมาตรฐานสเปกโตรโฟโตรเมทรี 14

4.2 กราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากสูตรคำนวณต่าง ๆ ในสเปกโตรโฟโตเมทรี 15

4.3 กราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากฟลูออโรเมทรี 16

4.4 กราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากสูตร JGOF และการเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์เอของกราฟมาตรฐานและสูตร JGOF จากเทคนิกฟลูออโรเมทรี 17

4.5 การเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์เอของกราฟมาตรฐานจากสเปกโตรโฟโตเมทรีและจากเทคนิคฟลูออโรเมทรี 17

4.6 การเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์เอของกราฟมาตรฐานจากสูตรต่างๆ ของสเปกโตรโฟโตเมทรีและกราฟมาตรฐานจากสูตรต่างๆ ของฟลูออโรเมทรี 18

4.7 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างแพลงก์ตอนอายุ 2 วัน 9 วัน และ 16วัน โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานและสูตรต่างๆ ของวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีและวิธีฟลูออโรเมทรี 19

4.8 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยโดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานและสูตรต่างๆ ของวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีและวิธีฟลูออโรเมทรี 21

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของสูตรต่างๆ จากค่าคลอโรฟิลล์เอที่คำนวณจากกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช 20

4.2 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของสูตรต่างๆ จากค่าคลอโรฟิลล์เอที่คำนวณจากกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 22

5.1 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรี 22

ก ความหนาแน่นของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช 26

ข1 ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีและวิธีฟลูออโรเมทรี 26

ข2 ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร 27

ข3 ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร 27

ข4 ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากสูตรคำนวณต่างๆ ในวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีและวิธีฟลูออโรเมทรี 28

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการศึกษา

คลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll *a*) เป็นรงควัตถุในคลอโรพลาสท์ที่พบในแพลงก์ตอนพืช ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล โดยมีบทบาทสำคัญเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยคลอโรฟิลล์เอทำหน้าที่หลัก 2 ประการ คือ การกักเก็บแสง และการแปลงพลังงานโฟตอนที่ดูดซับไปเป็นพลังงานเคมี (Björn *et al.,* 2009) นอกจากนี้ ค่าคลอโรฟิลล์เอยังสามารถใช้ประเมินกำลังการผลิตขั้นต้น (primary productivity) (Phromthong, 1999) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำ และประเมินศักย์การผลิตทรัพยากรสัตว์น้ำ (Lursinsap *et al*., 1986)

ปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คือ เทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งให้ค่าคลอโรฟิลล์เอแม่นยำที่สุด เนื่องจากใช้วิธีทางโครมาโทกราฟี (chromatography) เพื่อแยกคลอโรฟิลล์เอบริสุทธิ์ ก่อนทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจจับ (detector) อาทิ เครื่องตรวจวัดชนิดและปริมาณสารโดยหลักการดูดกลืนแสงแบบหลายความยาวคลื่น (Photodiode Array detector หรือ PDA) และเครื่องตรวจจับฟลูออเรสเซนส์ (Fluorescence detector) จึงไม่มีสัญญาณรบกวนจากรงควัตถุชนิดอื่นๆ อาทิ คลอโรฟิลล์บี (Chlorophyll b) และรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับคลอโรฟิลล์เอ แต่เนื่องจากห้องปฏิบัติการหลายแห่งไม่มีเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีราคาสูง ประกอบกับระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างค่อนข้างนาน และค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างที่สูง เมื่อเทียบกับเทคนิคการวิเคราะห์แบบอื่นๆ อาทิ เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และเทคนิคฟลูออโรเมทรี ห้องปฏิบัติการหลายแห่งจึงเลือกวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และเทคนิคฟลูออโรเมทรี ถึงแม้จะทราบว่า ทั้งสองเทคนิคดังกล่าวให้ค่าที่แตกต่างไปจากเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (Dos Santos *et al.,* 2003; Jacobsen *et al.,* 1990; Murray *et al.,* 1986; Pinckney *et al.,* 1994)

แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และเทคนิคฟลูออโรเมทรีอยู่หลายงาน (Dos Santos *et al.,* 2003; Jacobsen *et al.,* 1990; Murray *et al.,* 1986; Pinckney *et al.,* 1994) แต่การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และเทคนิคฟลูออโรเมทรี มีวิธีวิเคราะห์และมีสูตรคำนวณหลายแบบ ซึ่งการศึกษาเปรียบเทียบยังไม่ครอบคลุม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรี โดยใช้แพลงก์ตอนพืชที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ที่มีอายุเซลล์ต่างกัน เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างที่มีทั้งคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์ที่สลายตัว (phaeopigment) ซึ่งรบกวนการวิเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยใช้แพลงก์ตอนพืชที่มีอายุเซลล์ต่างกัน

2) เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคฟลูออโรเมทรี โดยใช้แพลงก์ตอนพืชที่มีอายุเซลล์ต่างกัน

1.3 ขอบเขตการศึกษา

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรี ด้วยวิธีวิเคราะห์และสูตรคำนวณต่างๆ โดยใช้แพลงก์ตอนพืชชนิด *Chattonella subsalsa* ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอายุเซลล์ต่างกัน เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างที่มีทั้งคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์ที่สลายตัว (phaeopigment) และเก็บตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเป็นตัวแทนของน้ำตัวอย่างในธรรมชาติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีที่เหมาะสม

2) ทราบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคฟลูออโรเมทรีที่เหมาะสม

3) ทราบข้อแตกต่าง รวมถึงข้อดีและข้อเสียของการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรี

บทที่ 2 ทฤษฎีและการศึกษาที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของคลอโรฟิลล์เอ

คลอโรฟิลล์เอเป็นรงควัตถุหรือสารประกอบทางเคมีที่ดูดซับและสะท้อนความยาวคลื่นเฉพาะของแสง และพบได้ในเซลล์ บริเวณเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (thylakoid membrane) ของออร์แกเนลล์ (organelle) ที่เรียกว่า คลอโรพลาสต์ (chloroplast) โดยมีประโยชน์สำหรับพืช เพราะทำหน้าที่สร้างพลังงานโดยการแปลงพลังงานแสงจากดวงอาทิตย์เป็นพลังงานเคมี บทบาทหลักของคลอโรฟิลล์ คือ การดูดซับพลังงานแสงเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) ซึ่งเป็นกระบวนการที่พืช สาหร่าย และแบคทีเรียบางชนิดแปลงพลังงานแสงจากดวงอาทิตย์เป็นพลังงานเคมี

แสงประกอบด้วยกลุ่มพลังงานที่เรียกว่า โฟตอน (photons) โดยมีรงควัตถุ (pigment) เช่น คลอโรฟิลล์ ทำหน้าที่ส่งต่อโฟตอนผ่านกระบวนการที่ซับซ้อน จนถึงบริเวณที่เรียกว่า ศูนย์ปฏิกิริยา (reaction center) หลังจากที่โฟตอนไปถึงศูนย์ปฏิกิริยา พลังงานจะถูกแปลงเป็นพลังงานเคมี โดยคลอโรฟิลล์เอจะดูดซับแสงจากบริเวณแสงสีส้มแดงและสีน้ำเงินม่วงของสเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic spectrum) ถ่ายเทพลังงานไปยังศูนย์ปฏิกิริยาและส่งอิเล็กตรอนไปยังห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) หน้าที่หลักของคลอโรฟิลล์เอ คือ เป็นตัวให้อิเล็กตรอนตัวแรก (primary electron donor) ในระบบถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการแปลงพลังงานจากดวงอาทิตย์ให้เป็นพลังงานเคมี ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงภายในเซลล์ได้ (Martin, 1999)

2.2 แพลงก์ตอนพืช

แพลงก์ตอนพืช (phytoplankton) หรือสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) คล้ายกับพืชบนบก เพราะมีคลอโรฟิลล์และต้องการแสงแดดเพื่อที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อสร้างพลังงานให้มีชีวิตอยู่และเติบโต แพลงก์ตอนพืชส่วนใหญ่จะลอยตัวและลอยอยู่ในมหาสมุทรตอนบนซึ่งมีแสงแดดส่องผ่านน้ำ นอกจากนี้แพลงก์ตอนพืชยังต้องการสารอาหารอนินทรีย์ เช่น ไนเตรต ฟอสเฟต และกำมะถัน โดยจะเปลี่ยนสารอาหารเหล่านี้เป็นสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต (Falkowski *et al*., 2004)

แพลงก์ตอนพืชชนิด *Chattonella* sp. ประกอบด้วยคลอโรพลาสต์สีน้ำตาลทองภายในเซลล์ เซลล์มีรูปร่างและขนาดไม่คงที่แน่นอน เช่น โค้งมน หรือบางสายพันธุ์มีรูปร่างคล้ายไข่ปลา ขนาดความยาวและความกว้างของเซลล์อยู่ระหว่าง 19.7–90.0 ไมโครเมตร ถึง 18.5–41.7 ไมโครเมตร (Band-Schmidt *et al*., 2012)

รูปที่ 2.1 แพลงก์ตอนพืชชนิด *Chattonella* sp. (Band-Schmidt *et al*., 2012)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ

วิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีหลากหลายวิธี โดยปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ 3 วิธี ได้แก่ เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เทคนิคฟลูออโรเมทรี และเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

2.3.1) เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

หลักการทำงาน UV-VIS Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (Ultra violet หรือ UV) และแสงสีขาว (Visible หรือ VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190-1,000 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสาร เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้น จึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ โดยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer มีส่วนประกอบหลายส่วนดังนี้ (Tan *et al*., 1998)

(1) แหล่งกำเนิดแสง (light source)

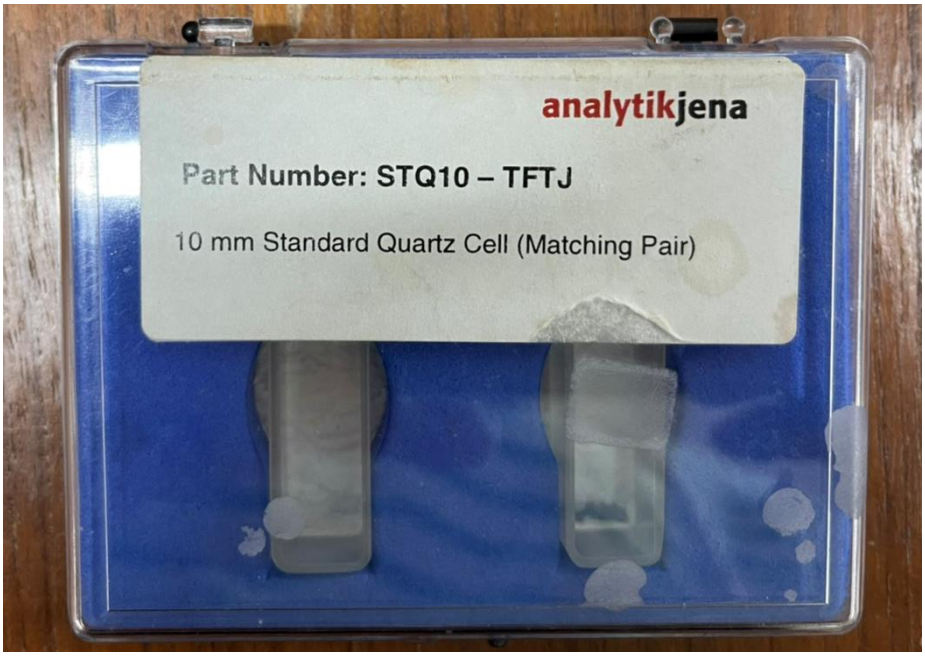
เป็นแหล่งที่ให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและความเข้มแสงที่คงที่ตลอดเวลา โดยแหล่งกำเนิดแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตจะใช้หลอด H_2 and D_2 lamp ให้ความยาวคลื่นในช่วง 160-380 นาโนเมตร ชนิดของสเปกโทรสโกปเป็นแบบ UV molecular absorption และช่วงแสงสีขาวจะใช้หลอด Tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 นาโนเมตร ชนิดของสเปกโทรสโกปีเป็นแบบ UV/visible/near-IR molecular absorption

(2) ตัวแยกแสง (monochromator)

ตัวแยกแสงมีหน้าที่ควบคุมแสง โดยทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติ (polychromatic) เปลี่ยนเป็นแสงโมโนโครเมติก (monochromatic) ซึ่งเป็นแถบแสงแคบหรือมีความยาวคลื่นเดียว โดยใช้ฟิลเตอร์ (กระจกสี) ปริซึม (prism) หรือ เกรตติ้ง (grating)

(3) เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (cell sample)

เซลล์ในการใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง เรียกว่า คิวเวทท์ (cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา จะใช้ได้เฉพาะช่วงแสงขาว เพราะเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ตซ์ (quartz) จะใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล



รูปที่ 2.2 คิวเวทท์ควอร์ตซ์ analytikjena 10 มิลลิเมตร

(4) เครื่องตัวจับ (detector)

เครื่องตัวจับทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืน โดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง แม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon diode detector)

2.3.2) เทคนิคฟลูออโรเมทรี

เทคนิคฟลูออโรเมทรี (Fluorometry) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสารโดยการอาศัยการกระตุ้นอิเล็กตรอนจากระดับชั้นพลังงานสถานะพื้น (ground state) ไปสู่ออร์บิทัล (orbital) ที่สูงขึ้นทำให้

อิเล็กตรอนอยู่ในระดับชั้นพลังงานที่สูงขึ้น (excited state) เพื่อรักษาเสถียรภาพของอิเล็กตรอน จึงมีการปลดปล่อยพลังงานและตกลงมาในชั้นระดับพลังงานที่ต่ำกว่าทำให้เกิดการคายโฟตอน (emission of photon) และเกิดเป็นสเปกตรัมในช่วงฟลูออเรสเซนต์ ณ ค่าพลังงานที่กระตุ้นที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ มีองค์ประกอบดังนี้ (Lakowicz, 1985)

(1) แหล่งกำเนิดแสง

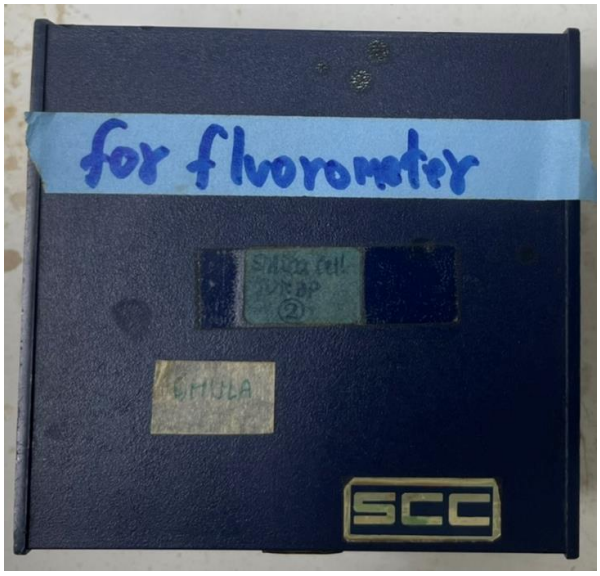
นิยมใช้หลอดซีนอน (xenon lamp) มากที่สุด เพราะสามารถปล่อยคลื่นแสงที่ความเข้มมากออกมาในช่วงกว้างพอเพียงสำหรับการวิเคราะห์สารต่างๆ ในช่วง 190-1,200 นาโนเมตร

(2) ตัวแยกแสงตกกระทบ

มีหน้าที่กรองแสงที่ไม่ต้องการให้ตกกระทบสารตัวอย่างออก ตัวแยกแสงตกกระทบควรให้ลำแสงตกกระทบที่มีความเข้มสูง และควรมีความยาวคลื่นแสงที่เข้มมากของหลอดไฟกำเนิดแสง

(3) เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง

คิวเวทท์ (cuvettes) ที่ใช้ควรทำจากควอทซ์ เนื่องจากสามารถใช้งานได้ในทุกช่วงความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 190-2,700 นาโนเมตร



รูปที่ 2.3 คิวเวทท์ควอร์ตซ์ SCC 10 มิลลิเมตร

(4) ตัวแยกแสงปล่อยออก (emission filter)

ตัวแยกแสงปล่อยออกมีหน้าที่ตัดแสงรบกวนต่าง ๆ เช่น Rayleigh scattering และ Raman scattering จากนั้นปล่อยเฉพาะแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการผ่านสู่ตัวไวแสง

(5) ตัวกรองแสง (optical filter)

มีหน้าที่กรองคลื่นแสงที่ปลอยออกมาจากตัวแยกแสงปลอยออก เพื่อเลือกชวงความยาวคลื่นบางช่วงใหตกกระทบตัวไวแสง ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการวัดใหมากขึ้น

(6) ตัวไวแสง (light detertor)

ใช้เพื่อขยายความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ที่ปล่อยออกมาที่จากเดิมมีความเข้มน้อยให้มีความเข้มมากขึ้นจนวงจรอิเล็กทรอนิกส์สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง ผ่านการขยายจำนวนโฟตอนจำนวนมาก

2.3.3) เทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

นำสารสกัดไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยหลักการทางโครมาโทกราฟฟี ซึ่งทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจจับ (detector) อาทิ Photodiode Array detector (PDA) และ Fluorescence detector จากนั้นนำพื้นที่ใต้พีค (peak) ของคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างมาวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอ ที่พล็อต (plot) ระหว่างพื้นที่ใต้พีค (peak) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอในหน่วยไมโครกรัมต่อลิตร

วิธีการทาง HPLC มีระบบตัวทำละลายหลายระบบ ยกตัวอย่าง อาจใช้ตัวทำละลาย 3 ตัว คือ ตัวทำละลาย A (80:20, v:v, เมทานอล: 0.5 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต, pH=7.2) ตัวทำละลาย B (90:10, v:v, อะซิโตไนไตรล์: น้ำ) และตัวทำละลาย C (เอทิลอะซิเตต) โดยนาทีที่ 0.0-2.0 ใช้ระบบ 100% A นาทีที่ 2.0-2.6 เปลี่ยนจากระบบ 100% A เป็นระบบ 100% B นาทีที่ 2.6-13.6 เปลี่ยนจากระบบ 100% B เป็นระบบ 90% B 10% C นาทีที่ 13.6-18.0 เปลี่ยนเป็นระบบ 65% B 35% C นาทีที่ 18.0-23.0 เปลี่ยนเป็นระบบ 31% B 69% C นาทีที่ 23.0-25.0 เปลี่ยนเป็นระบบ 31% B 69% C นาทีที่ 25.0-26.0 เปลี่ยนเป็นระบบ 100% B และนาทีที่ 26.0-34.0 เปลี่ยนเป็นระบบ 100% A โดยผ่านการ์ดคอลัมน์ C18 (guard column: 50 x 4.6 mm, ODS-2 C18 packing material, 5 µm particle size) และคอลัมน์ C18 (250 x 4.6 mm, ODS-2 Spherisorb column, 5 µm particle size) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (Knap *et al.,* 1996)

บทที่ 3 วิธีการศึกษา

3.1 การเตรียมการปฏิบัติการ

3.1.1) การเตรียมสารมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอ

เตรียมสารมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอ ที่ทำการจัดซื้อจากบริษัทซิกม่าอัลดริช (ประเทศไทย) จำกัด (Sigma-Aldrich (Thailand) Co., Ltd.) ใน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.05 0.1 0.5 1 10 20 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอสำหรับตัวอย่างน้ำบริเวณปากแม่น้ำ บริเวณใกล้ฝั่ง และบริเวณไกลฝั่ง ตามลำดับ

รูปที่ 3.1 สารมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอ 9 ความเข้มข้น

3.1.2) การสกัดคลอโรฟิลล์เอ

กรองแพลงก์ตอนพืชปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง GF/F และตัดกระดาษกรองดังกล่าว เป็น 4 ส่วน ใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (Falcon tube) ที่ทึบแสง ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติมอะซิโตนที่ความเข้มข้น 90% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง ในอ่างโซนิเคเตอร์ (sonicator) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ก่อนทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอด้วยวิธีต่างๆ

รูปที่ 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลล์เอ

3.2 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

3.2.1) การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

นำสารสกัดไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Analytikjena SPECORD 200 PLUS) โดยใช้คิวเวทท์ (cuvette) ที่มีความกว้าง 1 เซนติเมตร เพื่อคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอในหน่วยไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับวิธีการวิเคราะห์จะทำการวิเคราะห์ 1) เทียบกับกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอ ที่ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร และ 664 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่คลอโรฟิลล์เอดูดกลืนแสงได้สูงสุด และ 2) คำนวณจากสูตรคำนวณต่างๆ โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นตามสูตรคำนวณดังนี้

(1) (Parsons & Strickland., 1963):

R. (Richards)	Chl a = 15.6 E665 – 2.0 E645 – 0.8 E630
P.S (Parsons & Stickland)	Chl a = 11.6 E665 – 1.31 E645 – 0.14 E630
S.U. (SCOR/UNESCO)	Chl a = 11.64 E663 – 2.16 E645 + 0.10 E630

(2) (Arnon, 1949):

Chl a (mg/mL) = 12.7 E663 – 2.69 E645

(3) (Axler & Owen., 1994):

Chlorophyll-a (µg/L) = [26.7(E664b- E665a) x VExtr] / (VSample x L)

โดยที่

b = before acidification

a = after acidification

E664b = [{Abs664(sample) - Abs664(blank)}] - [{Abs750(sample) – Abs750(blank)}]

E665a = [{Abs665(sample) - Abs665(blank)}] - [{Abs750(sample) – Abs750(blank)}]

VExtr = Volume of 90% Acetone used in extraction (ml)

VSample = Volume of water filtered (L)

L = Sample path lemgth (cm)

(4) (Lorenzen, 1967):

Chl a (mg/m3) = [A x K x (6640 – 665a) x v / (Vf x L)

โดยที่

A = absorption coefficient of chlorophyll a = 11.0

K = factor to equate the reduction in absorbancy to initial chlorophyll concentration, 1.7 : 0.7, or 2.43

6640 = absorbance before acidification

665a = absorbance after acidification

v = volume of 90% Acetone used in extraction (ml)

Vf = volume of water filtered (L)

L = path length of cuvette (cm)

รูปที่ 3.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.3 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคฟลูออโรเมทรี

3.3.1) การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคฟลูออโรเมทรี

นำสารสกัดไปวัดความเข้มแสงด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ (PerkinElmer LS 55 Luminescence spectrometer) เพื่อคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอในหน่วยไมโครกรัมต่อลิตร โดยทำการวิเคราะห์ 1) เทียบกับกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอ ซึ่งดูดกลืนแสง (absorption) ที่ 430 นาโนเมตร และ

ปล่อยพลังงาน (emission) ที่ 663 นาโนเมตร และเทียบกับกราฟมาตรฐานผลต่างความเข้มแสงของคลอโรฟิลล์เอก่อนและหลังหยดกรดไฮโดรคลอริก 1.2 โมลาร์ จำนวน 2-3 หยด ซึ่งดูดกลืนแสง (absorption) และปล่อยพลังงาน (emission) ที่ความยาวคลื่นดังกล่าวข้างต้น และ 2) คำนวณจากสูตรคำนวณดังนี้

(Knap et al.,1996) :

Chl (µg/l) = (Fm/Fm-1) x (F0-Fa) x Kx x (volex/ volfilt)

โดยที่

Fm = acidification coefficient (Fo/Fa) for pure Chl a (usually 2.2).

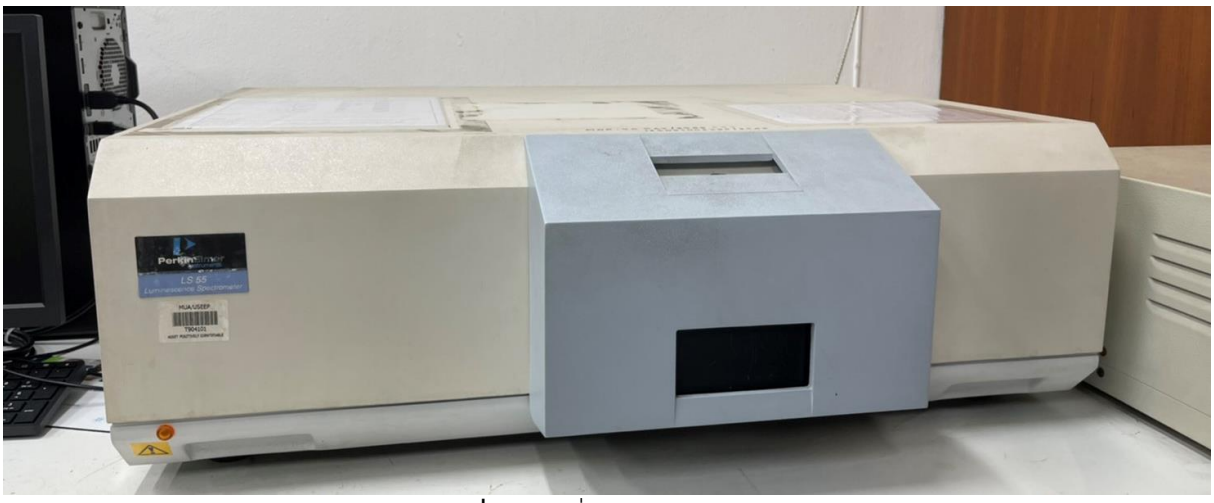
Fo = reading before acidification

Fa = reading after acidification

Kx = door factor from calibration calculations

volex = extraction volume

volfilt = sample volume



รูปที่ 3.4 เครื่องฟลูออโรมิเตอร์

3.4 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

3.4.1) การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช

เพาะเลี้ยงไมโครแพลงก์ตอนพืชชนิด *Chattonella subsalsa* แบบสายพันธุ์บริสุทธิ์ (aseptic clonal culture) ในห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการเพาะเลี้ยง ในอาหารสูตร T1 (Ogata et al., 1987) ด้วยน้ำทะเล ที่มีความเค็ม 28 psu ในขวดแก้วฝาเกลียว (Duran bottle) ขนาด 2 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหาร 1.5 ลิตร และนำไป

เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยง ที่ควบคุมปัจจัยความเข้มแสง (54 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) และอุณหภูมิ (25 องศาเซลเซียส) โดยให้ระยะเวลาได้รับแสงต่อระยะเวลาไม่ได้รับแสงเป็น 12:12 ชั่วโมง

3.4.2) การเตรียมตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

เตรียมตัวอย่างสำหรับการทดลอง 3 ส่วน คือ (1) แพลงก์ตอนพืชในระยะที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากร (lag phase; วันที่ 2) (2) แพลงก์ตอนพืชในระยะที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากร (log phase; วันที่ 9) และ (3) แพลงก์ตอนพืชในระยะที่มีอัตราการลดลงของประชากร (death phase; วันที่ 16) (สุนิดา. 2562) โดยการทดลองทั้งสองส่วน ให้เตรียมตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่มีความหนาแน่นเซลล์ 30,000 15,000 และ 5,000 เซลล์ต่อลิตร เพื่อเป็นตัวแทนน้ำบริเวณปากแม่น้ำ บริเวณใกล้ฝั่ง และบริเวณไกลฝั่ง ตามลำดับ (สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. 2545) และทำการทดลอง 5 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง

3.5.3) การนับจำนวนเซลล์แพลงก์ตอนพืช

สุ่มนับตัวอย่างไมโครแพลงก์ตอนพืช *C. subsalsa* ที่เจือจาง 10 เท่า ด้วยสไลด์เซดจ์วิค (Sedgewick-Rafter counting chamber) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า และคำนวณจำนวนแพลงก์ตอนพืชในหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามสมการที่ (1)

จำนวนแพลงก์ตอนพืช (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) = N x D (1)

เมื่อ N = จำนวนแพลงก์ตอนเฉลี่ยที่นับได้ (cell/mL)
D = จำนวนเท่าที่เจือจาง

3.5 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.1) การเก็บข้อมูลและการเตรียมตัวอย่าง

เก็บน้ำตัวอย่างบริเวณผิวน้ำใส่กะละมังขนาด 5 ลิตร กวนน้ำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยแท่งแก้วคนสารขนาด 50 เซนติเมตร ชะขวดเก็บตัวอย่างที่ห่อฟอยล์ไว้ด้วยน้ำตัวอย่างเล็กน้อย ต่อมาตวงน้ำตัวอย่าง 1000 มิลลิลิตรด้วยกระบอกตรงพลาสติกแล้วนำไปเทใส่ขวดเก็บน้ำตัวอย่างนั้น

จากนั้นค่อยๆ กรองน้ำตัวอย่าง ผ่านกระดาษกรอง GF/F ทีละ 1 มิลลิลิตร จนกว่ากระดาษกรองจะตัน แล้วจดปริมาตรน้ำที่กรอง และตัดกระดาษกรองดังกล่าวเป็น 4 ส่วน ใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (Falcon tube) ที่ทึบแสง ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติมอะซิโตนที่ความเข้มข้น 90% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง ในอ่างโซนิเคเตอร์ (sonicator) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที

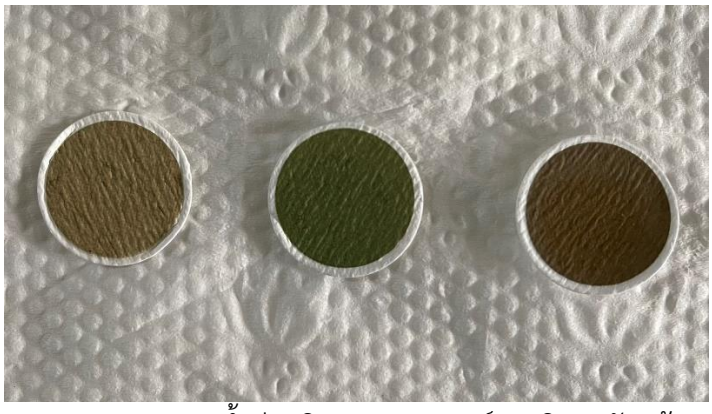
และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ก่อนทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอด้วยวิธีต่างๆ

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 3.5.1 บ่อน้ำบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ก) ตึกจุลจักรพงษ์ (ข) ศาลาพระเกี้ยว (ค) ตึกฟิสิกส์

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 3.5.2 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ก) ตึกจุลจักรพงษ์ (ข) ศาลาพระเกี้ยว (ค) ตึกฟิสิกส์



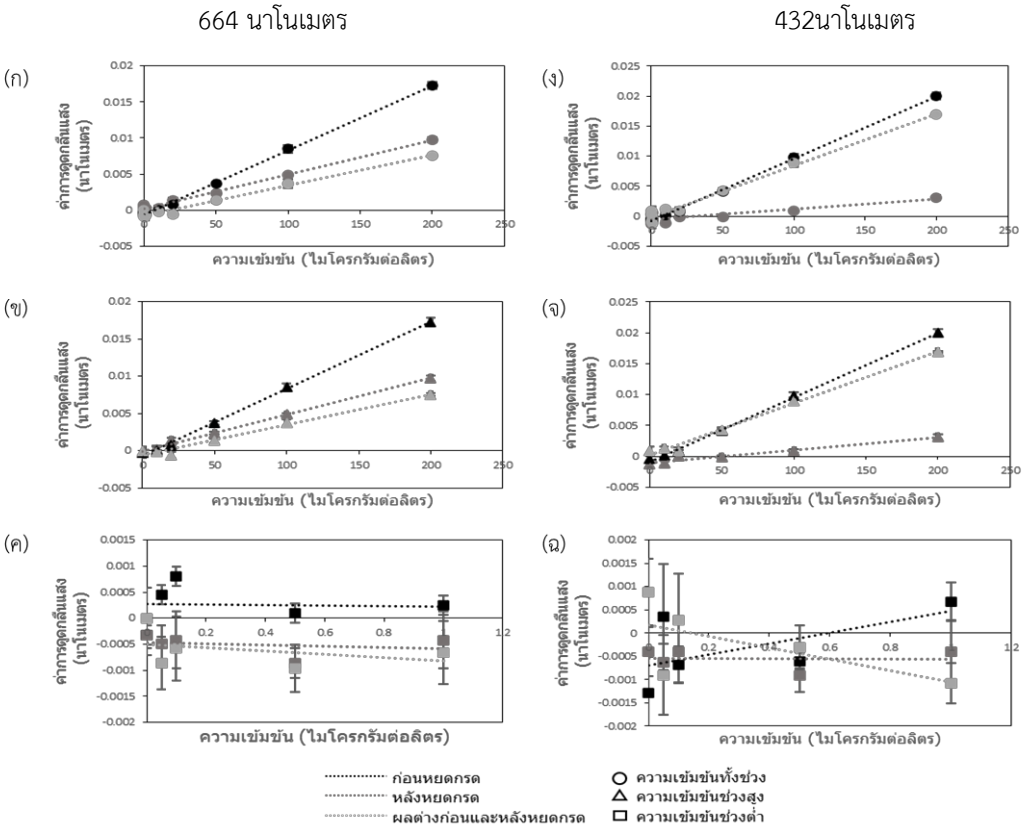
รูปที่ 3.5.3 กระดาษกรองน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ซ้าย) ตึกจุลจักรพงษ์ (กลาง) ศาลาพระเกี้ยว (ขวา) ตึกฟิสิกส์

บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

4.1 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

4.1.1) กราฟมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 432 และ 664 นาโนเมตร

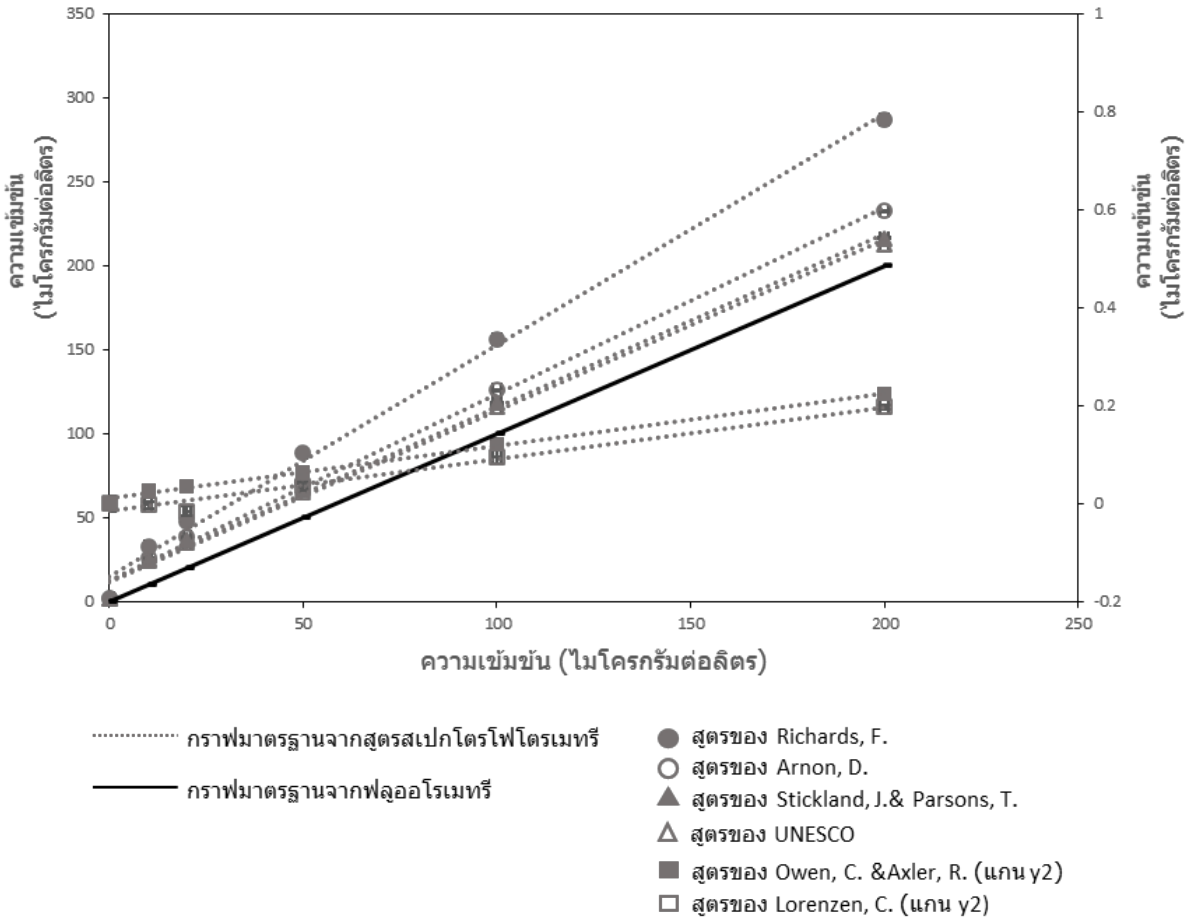
จากกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีที่วัดในสองความยาวคลื่น คือ 432 นาโนเมตร และ 664 นาโนเมตร โดยแบ่งออกเป็นสามช่วงความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นทั้งช่วง (0 0.05 0.1 0.5 1 10 20 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร) ช่วงสูง (0 10 20 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร) และช่วงต่ำ (0 0.05 0.1 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร) พบว่า ที่ผลต่างของก่อนและหลังหยดกรด ณ ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.00004 0.00004 และ -0.0003 ตามลำดับ และผลต่างของก่อนและหลังหยดกรด ณ ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.00009 0.00008 และ -0.0012 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ความชันที่ความเข้มข้นช่วงต่ำมีความแม่นยำน้อยและมีความชันที่แตกต่างจากการใช้ความเข้มข้นทั้งช่วงและช่วงสูงเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงควรใช้ความชันที่ช่วงความเข้มข้นสูงมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณ คลอโรฟิลล์ โดยค่า detection limit ของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Analytikjena SPECORD 200 PLUS) คือ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานสเปกโตรโฟโตรเมทรี (ก-ค) ที่ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร และ (ง-ฉ) ที่ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร

4.1.2) กราฟมาตรฐานจากสูตรคำนวณต่างๆ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

จากกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากสูตรคำนวณต่างๆ ในสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรี พบว่า กราฟมาตรฐานที่อยู่เหนือเส้นกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรีให้ค่าความชันมากกว่ากราฟมาตรจากฟลูออโร คือ สูตรของ Richard สูตรของ Arnon สูตรของ Stickland & Parsons และสูตรของ UNESCO ตามลำดับ แต่กราฟมาตรฐานที่อยู่ใต้เส้นกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรีให้ค่าความชันน้อยกว่ากราฟมาตรจากฟลูออโร คือ สูตรของ Owen & Axler และสูตรของ Lorenzen ตามลำดับ และจากผลกราฟมาตรฐานจากทุกสูตรพบว่า กราฟมาตรฐานจากสูตรของ UNESCO มีค่าความชันใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรีมากที่สุด



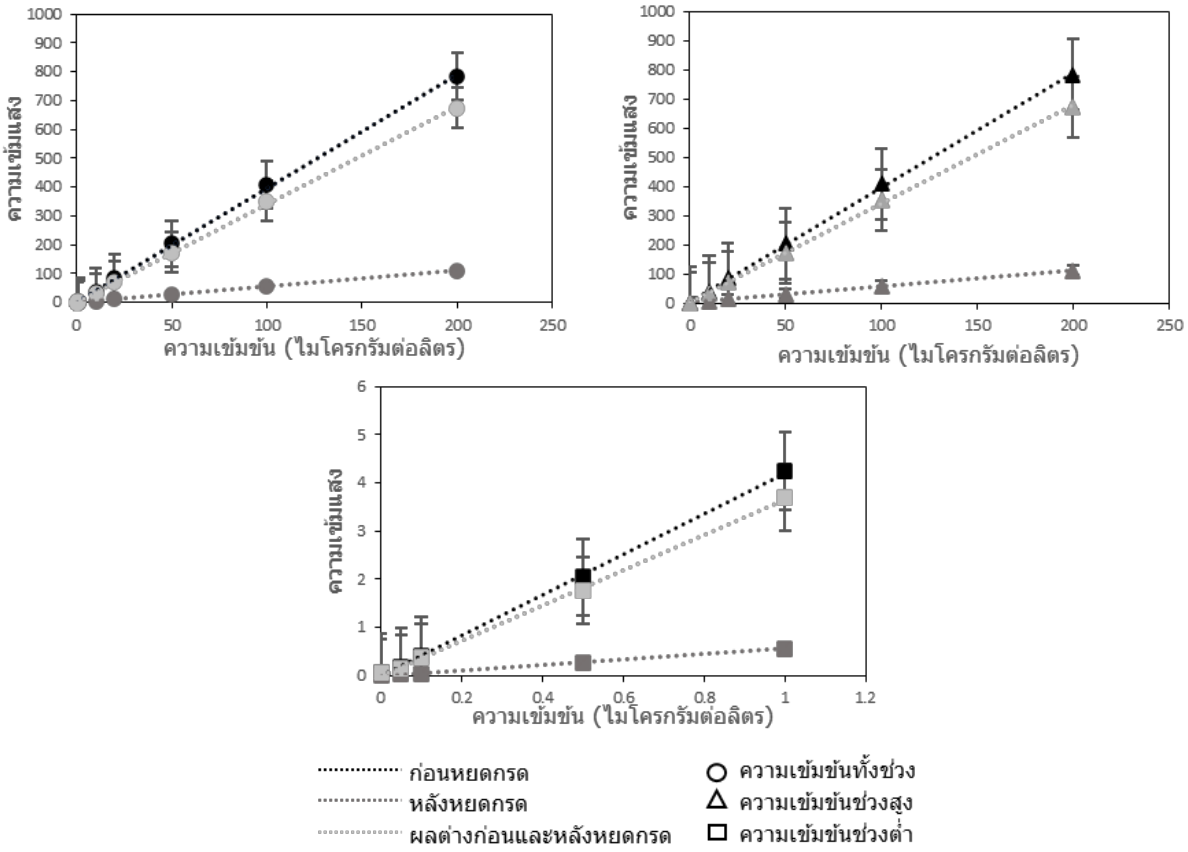
รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากสูตรคำนวณต่างๆ ในสเปกโตรโฟโตเมทรี

4.2 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคฟลูออโรเมทรี

4.2.1) กราฟมาตรฐานในเทคนิคฟลูออโรเมทรี

จากกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคฟลูออโรเมทรี โดยแบ่งออกเป็นสามช่วงความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นทั้งช่วง (0 0.05 0.1 0.5 1 10 20 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร) ช่วงสูง (0 10 20 50

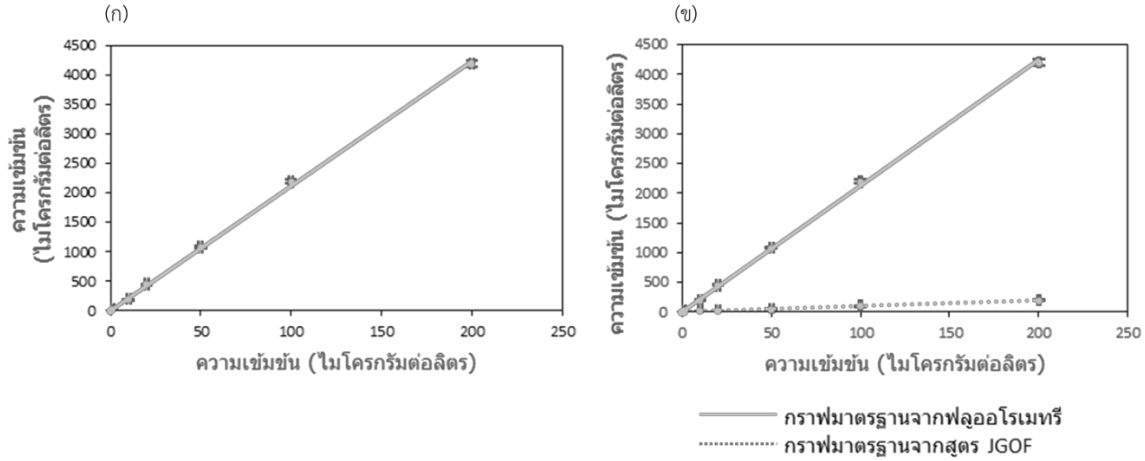
100 และ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร) และช่วงต่ำ (0 0.05 0.1 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร) พบว่า ที่ผลต่างของก่อนและหลังหยดกรด มีค่าความชันเท่ากับ 3.3958 3.3836 และ 3.6548 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ทุกช่วงความเข้มข้นมีความชันใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงสามารถนำความชันของทั้งช่วงความเข้มข้นมาใช้ในการคำนวณได้ค่ะ โดยค่า detection limit ของเทคนิคฟลูออโรเมทรี คือ 0.05 ไมโครกรัมต่อลิตร เนื่องจาก detection limit ของเทคนิคฟลูออโรเมทรีต่ำ และหลักการที่มีความจำเพาะในการวัดคลอโรฟิลล์เอ จึงจะใช้กราฟมาตรฐานของเทคนิคฟลูออโรเมทรีเป็นตัวเปรียบเทียบกับทุกวิธีคิด



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากฟลูออโรเมทรี

4.2.2) กราฟมาตรฐานจากสูตรคำนวณต่างๆ ในเทคนิคฟลูออโรเมทรี

จากภาพเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานระหว่างเทคนิคฟลูออโรเมทรีและสูตรของ JGOF พบว่า กราฟจากสูตรของ JGOF มีค่าความชันสูงกว่ากราฟมาตรฐานในเทคนิคฟลูออโรเมทรี คือ 21.141 และ 3.3958 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความคลาดเคลื่อนทางบวกถึง 84 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในสูตรคำนวณของ JGOF มีการคิดค่าคงที่ของกรดในสมการด้วยซึ่งแตกต่างจากทุกสูตรการคำนวณ จึงอาจทำให้มีความคาดเคลื่อนเพิ่มสูงขึ้น

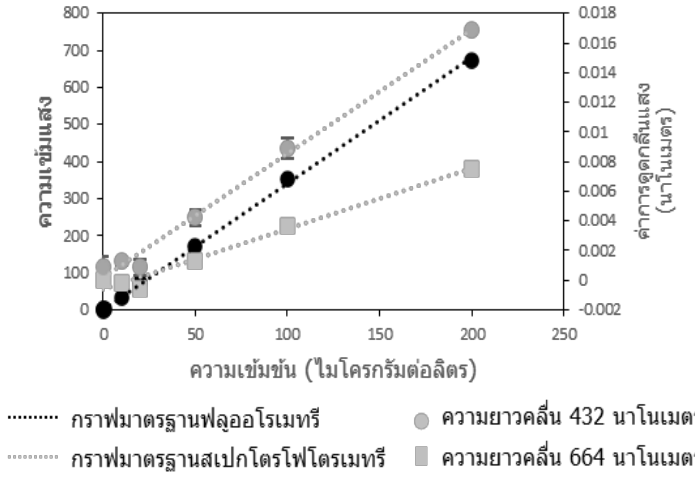


รูปที่ 4.4 (ก) กราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากสูตร JGOF และ (ข) การเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์เอของกราฟมาตรฐานและสูตร JGOF จากเทคนิกฟลูออโรเมทรี

4.3 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เทียบกับเทคนิคฟลูออโรเมทรี

4.2.1) กราฟมาตรฐานในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เทียบกับเทคนิคฟลูออโรเมทรี

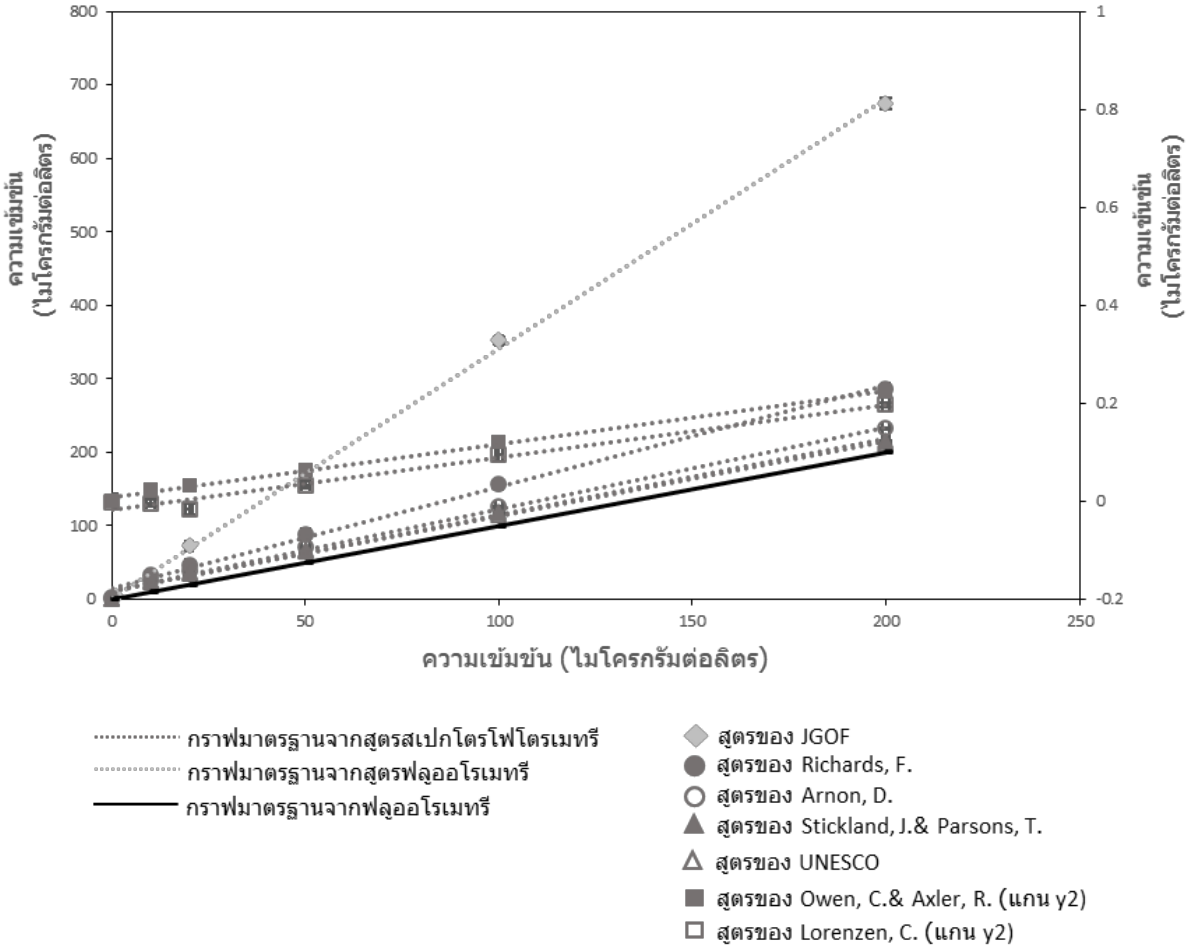
จากภาพเปรียบเทียบระหว่างกราฟมาตรฐานจากเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ณ ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร และ 432 นาโนเมตร กับกราฟมาตรฐานจากเทคนิคฟลูออโรเมทรี พบว่า กราฟมาตรฐานจากเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร มีความชันใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานจากเทคนิคฟลูออโรเมทรีที่สุด ดังนั้น ในการคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี จึงควรใช้กราฟมาตรฐานที่ 432 นาโนเมตร มาใช้ในการคำนวณ



รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์เอของกราฟมาตรฐานจากสเปกโตรโฟโตเมทรีและจากเทคนิคฟลูออโรเมทรี

4.2.2) กราฟมาตรฐานจากสูตรคำนวณต่างๆ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และเทคนิคฟลูออโรเมทรี

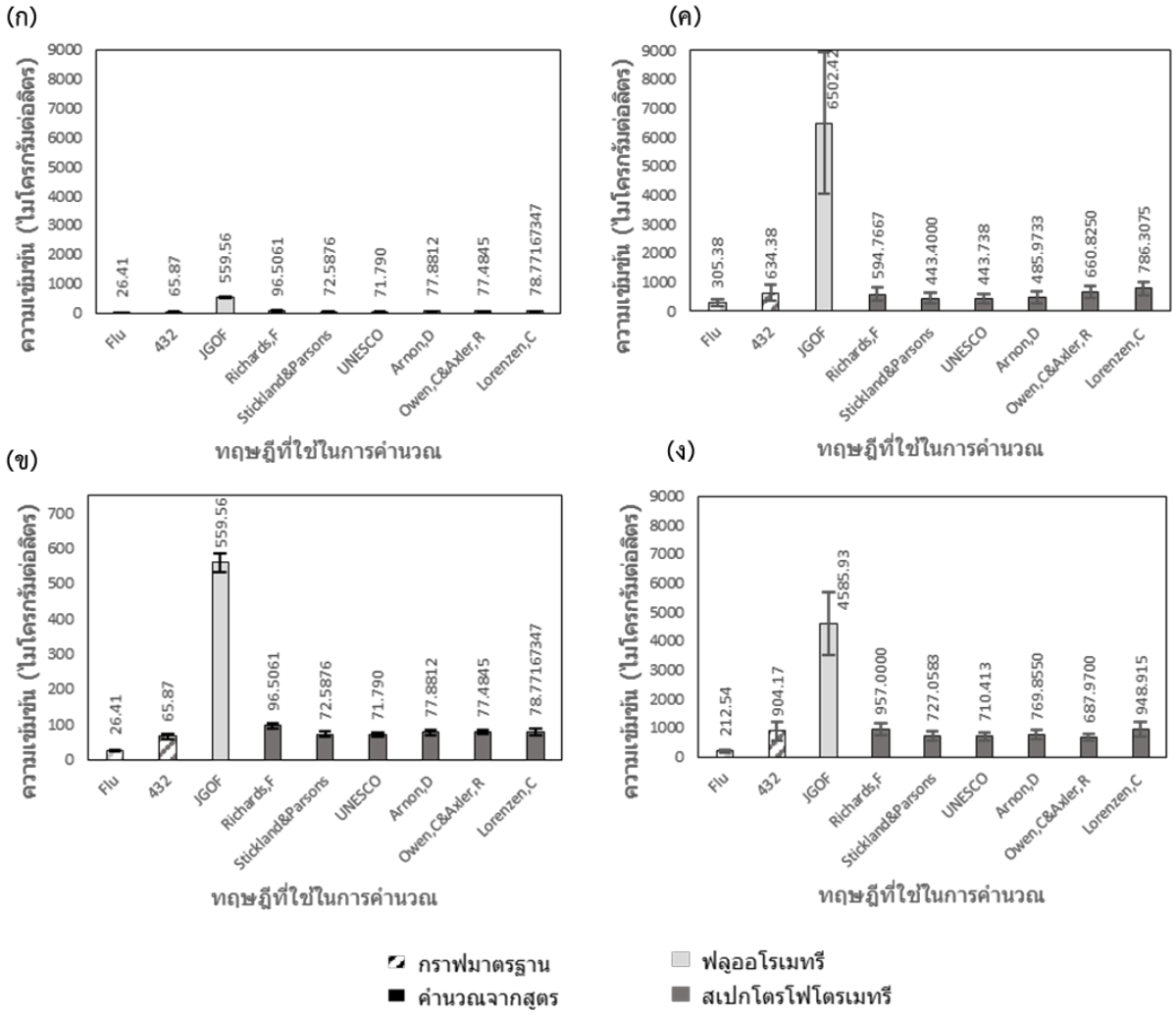
จากภาพเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานจากสูตรต่างๆ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และกราฟมาตรฐานจากสูตรต่างๆ เทคนิคฟลูออโรเมทรี ก็ยังคงพบว่า กราฟมาตรฐานของสูตรของ UNESCO มีค่าความชันใกล้เคียงกับกราฟมาตรจากฟลูออโรมากที่สุด



รูปที่ 4.6 การเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์เอของกราฟมาตรฐานจากสูตรต่างๆ ของสเปกโตรโฟโตเมทรี และกราฟมาตรฐานจากสูตรต่างๆ ของฟลูออโรเมทรี

4.4 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิคฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างแพลงก์ตอนที่อายุวันต่างๆ โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานและสูตรต่างๆ ของวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี และวิธีฟลูออโรเมทรี โดยกราฟด้านล่างกรอบสี่เหลี่ยม คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างแพลงก์ตอนอายุ 2 วัน ที่ทำการขยายสเกลให้เห็นภาพชัดขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในทุกวิธีการคำนวณ มีค่ามากกว่าการคำนวณด้วยกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรี โดยการคำนวณด้วยสูตรของ Stickland & Parsons และสูตรของ UNESCO มีค่าความคลาดเคลื่อนทางบวกน้อยที่สุดคือ 55 เปอร์เซ็น



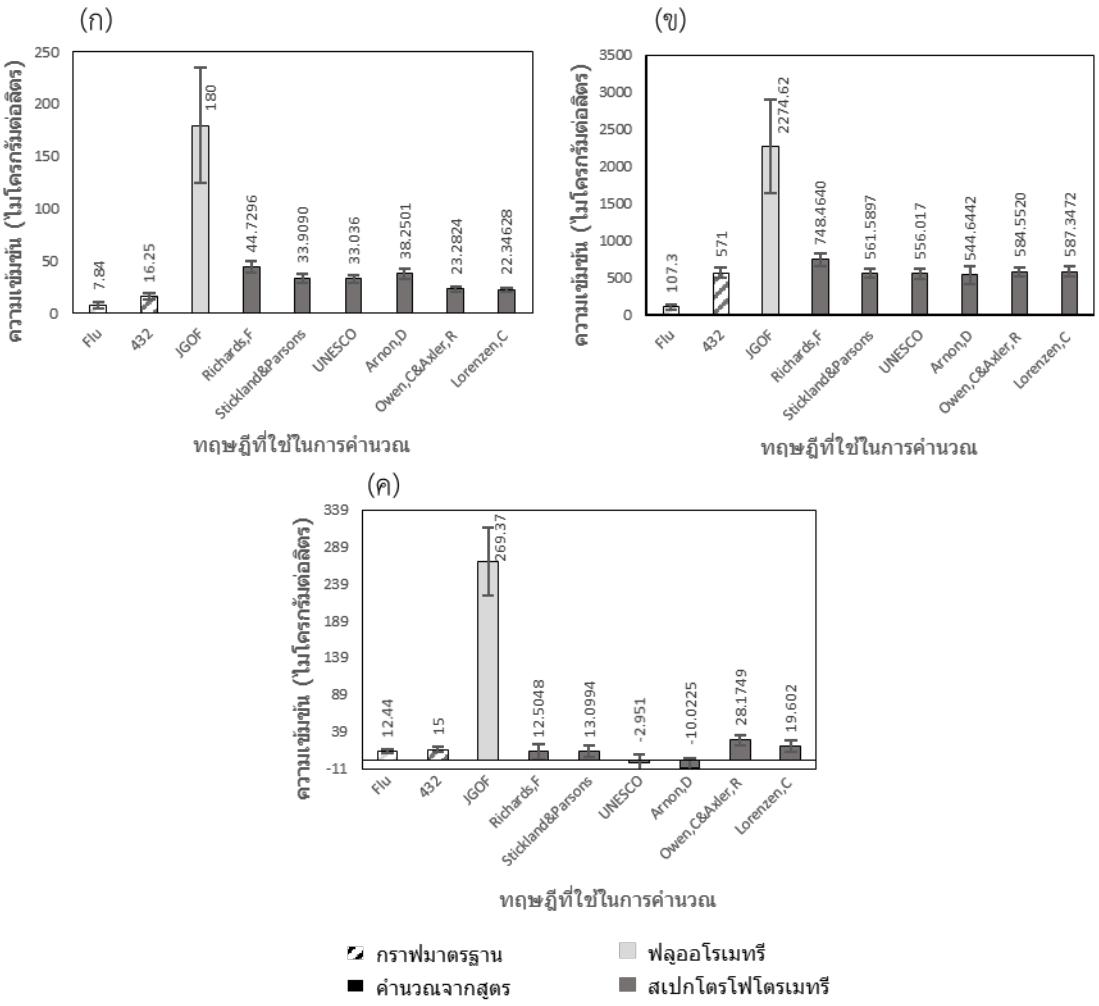
รูปที่ 4.7 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างแพลงก์ตอนอายุ (ก) 2 วัน (ข) 2 วันแบบขยายมาตราส่วน (ค) 9 วัน (ง) 16วัน โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานและสูตรต่างๆ ของวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีและวิธีฟลูออโรเมทรี

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของสูตรต่างๆ จากค่าคลอโรฟิลล์เอที่คำนวณจากกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

ทฤษฎีที่ใช้ในการคำนวณ	อายุแพลงก์ตอนพืช			เฉลี่ย
	2 วัน	9 วัน	16 วัน	
กราฟมาตรฐานที่ 432 นาโนเมตร	60	52	76	63
JGOF	95	95	95	95
Richards	73	49	78	66
Stickland & Parsons	64	31	71	55
UNESCO	63	31	70	55
Arnon	66	37	72	59
Owen & Axler	66	54	69	63
Lorenzen	66	61	78	68

4.5 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีและฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานและสูตรต่างๆ ของวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี และวิธีฟลูออโรเมทรี พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในทุกวิธีการคำนวณ มีค่ามากกว่าการคำนวณด้วยกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรี โดยการคำนวณด้วยสูตรของ Stickland, J. & Parsons, T. มีค่าความคลาดเคลื่อนทางบวกน้อยที่สุด คือ 55 เปอร์เซ็น ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช



รูปที่ 4.8 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ก) ตึกจุลจักรพงษ์ (ข) ศาลาพระเกี้ยว (ค) ตึกฟิสิกส์ โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานและสูตรต่างๆ ของวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีและวิธีฟลูออโรเมทรี

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของสูตรต่าง ๆ จากค่าคลอโรฟิลล์เอที่คำนวณจากกราฟมาตรฐานฟลูออโรเมทรีของตัวอย่างน้ำบ่อบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทฤษฎีที่ใช้ในการคำนวณ	**บ่อน้ำบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**			**เฉลี่ย**
	ตึกจุลฯ	**ศาลาฯ**	**ตึกฟิสิกส์**	
กราฟมาตรฐานที่ 432 นาโนเมตร	52	81	17	50
JGOF	96	95	95	95
Richards	82	86	1	56
Stickland & Parsons	77	81	5	54
UNESCO	76	81	124	94
Arnon	80	80	181	113
Owen & Axler	66	82	56	68
Lorenzen	65	82	37	61

บทที่ 5 สรุปผลศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอจากกราฟมาตรฐานและสูตรต่างๆ ของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ทุกวิธีมีค่าคลาดเคลื่อนทางบวก เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของเทคนิคฟลูออโรเมทรี อีกทั้งเมื่อเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 432 และ 664 นาโนเมตร พบว่า ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร มีความชันที่ใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานของเทคนิคฟลูออโรเมทรี มากกว่าความยาวเคลื่อน 664 นาโนเมตร

นอกจากนี้หากไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอจากกราฟมาตรฐานด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี และเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ผู้วิจัยขอแนะนำให้วิเคราะห์ค่าโดยใช้สูตร Stickland & Parsons หรือ UNESCO ของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เพราะให้ค่าที่ใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานของเทคนิคฟลูออโรเมทรี และใช้สูตร UNESCO ของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี สำหรับการวิเคราะห์น้ำทะเลตัวอย่าง

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และเทคนิคฟลูออโรเมทรี

วิธีวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
สเปกโตรโฟโตเมทรี	ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน เพียงหนึ่งนาทีต่อตัวอย่าง และสามารถสแกนผลได้หลายช่วงความยาวคลื่นในครั้งเดียว	มีความแม่นยำต่ำกว่า เนื่องจากมีค่าขีดต่ำสุดการวิเคราะห์สูง และวิธีวิเคราะห์ที่ไม่ได้เจาะจงไปที่คลอโรฟิลล์เอโดยตรง
ฟลูออโรเมทรี	มีความแม่นยำสูงกว่า เนื่องจากมีวิธีวิเคราะห์ที่เจาะจงไปที่คลอโรฟิลล์เอ และมีค่าขีดต่ำสุดการวิเคราะห์ต่ำ	ใช้เวลานานกว่า และมีราคาสูง

หมายเหตุ: ไม่รวมระยะเวลาการสกัด

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำกราฟมาตรฐานเพิ่มในความเข้มข้นช่วงต่ำของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เพื่อหาค่าขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (detection limit) ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และเพิ่มสูตรคำนวณจากทั้งสองเทคนิค นอกจากนี้ควรเพิ่มการเปรียบเทียบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography หรือ HPLC) ทั้งนี้ที่การวิจัยนี้ไม่ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบกับวิธี HPLC เนื่องจากสถานณการณ์แพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถเข้าไปทำการทดลองในห้องปฏิบัติการได้

เอกสารอ้างอิง

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. (2545). สภาวะแวดล้อมทางทะเลในบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก. สถาบัน วิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

สุนิดา ปานเพชร, “การเปรียบเทียบกำลังกานผลิตขั้นต้นของแพลงก์ตอนพืชต่างขนาด,” (โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2562).

Björn, L. O., Papageorgiou, G. C., & Blankenship, R. E. (2009). A viewpoint: why chlorophyll a?. Photosynthesis research, 99(2), 85-98.

Pinckney, J., Papa, R., & Zingmark, R. (1994). Comparison of high-performance liquid chromatographic, spectrophotometric, and fluorometric methods for determining chlorophyll a concentrations in estaurine sediments. Journal of Microbiological Methods, 19(1), 59-66.

Parsons, T. R., & Strickland, J. D. H. (1963). Discussion of spectrophotometric determination of Marine-plant Pigments, with Revised Equations far Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. J. mar. Res, 21, 155-163.

Murray, A. P., Gibbs, C. F., Longmore, A. R., & Flett, D. J. (1986). Determination of chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorometric methods. Marine chemistry, 19(3), 211-227.

Knap, A. H., Michaels, A., Close, A. R., Ducklow, H., & Dickson, A. G. (1996). Protocols for the joint global ocean flux study (JGOFS) core measurements. JGOFS, Reprint of the IOC Manuals and Guides No. 29, UNESCO 1994, 19.

Phromthong, I. (1999). Dynamics and diversity of phytoplankton in Tha Chin estuary, Samut Sakhon province. In *MSc Thesis*. (pp. 1-141). Bangkok: Chulalongkorn University. (in Thai)

Lursinsap, A., Chaiyakham, K. & Sirimontaporn, P. (1986). Primary production and the potential of fish production in Songkra lake. In *Proceeding Kasetsart University Seminar*. (pp. 156-163). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Dos Santos, A. C. A., Calijuri, M. D. C., Moraes, E. M., Adorno, M. A. T., Falco, P. B., Carvalho, D. P., ... & Benassi, S. F. (2003). Comparison of three methods for Chlorophyll determination: Spectrophotometry and Fluorimetry in samples containing pigment

mixtures and spectrophotometry in samples with separate pigments through High Performance Liquid Chromatography. Acta Limnol. Bras, 15(3), 7-18.

Jacobsen, T. R., & Rai, H. (1990). Comparison of spectrophotometric, fluorometric and high performance liquid chromatography methods for determination of chlorophyll a in aquatic samples: effects of solvent and extraction procedures. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 75(2), 207-217.

Murray, A. P., Gibbs, C. F., Longmore, A. R., & Flett, D. J. (1986). Determination of chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorometric methods. Marine chemistry, 19(3), 211-227.

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

Axler, R. P., & Owen, C. J. (1994). Measuring chlorophyll and phaeophytin: whom should you believe?. Lake and Reservoir Management, 8(2), 143-151.

Martin, Lorin. (2021, August 22). What Are the Roles of Chlorophyll A & B?. sciencing.com. Retrieved from https://sciencing.com/what-are-the-roles-of-chlorophyll-a-b-12526386.html

Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. science, 305(5682), 354-360.

Band-Schmidt, C. J., Martinez-Lopez, A., Bustillos-Guzmán, J. J., Carréon-Palau, L., Morquecho, L., Olguín-Monroy, N. O., ... & Tomas, C. (2012). Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California. Hydrobiologia, 693(1), 81-97.

Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K., & Wong, S. M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first UV-spectrophotometry method of determination. Talanta, 45(4), 713-719.

Lakowicz, J. R. (1985). Fluorescence spectroscopy; principles and application to biological macromolecules. In New Comprehensive Biochemistry (Vol. 11, pp. 1-26). Elsevier.

ภาคผนวก

ก. ความหนาแน่นของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

ตารางที่ ก ความหนาแน่นของตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

อายุแพลงก์ตอนพืช (วัน)	จำนวนแพลงก์ตอนพืช (เซลล์) ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ความหนาแน่น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
0	-	-	-	500	500
2	144	149	147	147	1467
9	785	765	775	775	7750
16	502	492	497	497	4970

ข. ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีและวิธีฟลูออโรเมทรี

ตารางที่ ข1 ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในวิธีฟลูออโรเมทรี

ความเข้มข้น	การหยดกรด	สมการเส้นตรง	ความชัน
ช่วงต่ำ	ก่อนหยดกรด	y = 4.2207x - 0.0065	4.2207
	หลังหยดกรด	y = 0.5659x - 0.0064	0.5659
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = 3.6548x - 0.0001	3.6548
ช่วงสูง	ก่อนหยดกรด	y = 3.9413x + 4.1977	3.9413
	หลังหยดกรด	y = 0.5576x + 1.0128	0.5576
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = 3.3836x + 3.1848	3.3836
ทั้งช่วง	ก่อนหยดกรด	y = 3.9574x + 1.9402	3.9574
	หลังหยดกรด	y = 0.5616x + 0.4523	0.5616
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = 3.3958x + 1.4879	3.3958

ตารางที่ ข2 ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร

ความเข้มข้น	การหยดกรด	สมการเส้นตรง	ความชัน
ช่วงต่ำ	ก่อนหยดกรด	y = -0.0001x - 0.0005	-0.0001
	หลังหยดกรด	y = -4E-05x + 0.0003	-0.00004
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = -0.0003x - 0.0005	-0.0003
ช่วงสูง	ก่อนหยดกรด	y = 9E-05x - 0.0007	0.00009
	หลังหยดกรด	y = 5E-05x - 8E-05	0.00005
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = 4E-05x - 0.0006	0.00004
ทั้งช่วง	ก่อนหยดกรด	y = 9E-05x - 0.0006	0.00009
	หลังหยดกรด	y = 5E-05x + 0.0002	0.00005
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = 4E-05x - 0.0007	0.00004

ตารางที่ ข3 ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอในวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 432 นาโนเมตร

ความเข้มข้น	การหยดกรด	สมการเส้นตรง	ความชัน
ช่วงต่ำ	ก่อนหยดกรด	y = -3E-05x - 0.0005	-0.00003
	หลังหยดกรด	y = 0.0012x - 0.0007	0.0012
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = -0.0012x + 0.0002	-0.0012
ช่วงสูง	ก่อนหยดกรด	y = 0.0001x - 0.0009	0.0001
	หลังหยดกรด	y = 2E-05x - 0.0011	0.00002
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = 8E-05x + 0.0002	0.00008
ทั้งช่วง	ก่อนหยดกรด	y = 0.0001x - 0.0007	0.0001
	หลังหยดกรด	y = 2E-05x - 0.0005	0.00002
	ผลต่างก่อน-หลังหยดกรด	y = 9E-05x - 0.0002	0.00009

ตารางที่ ข4 ความชันของกราฟมาตรฐานคลอโรฟิลล์เอจากสูตรคำนวณต่างๆ ในวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีและวิธีฟลูออโรเมทรี

ทฤษฎีที่ใช้ในการคำนวณ	สมการเส้นตรง	ความชัน
JGOF	y = 21.141x + 9.263	21.141
Richards	y = 1.3771x + 14.882	1.3771
Stickland & Parsons	y = 1.0361x + 11.817	1.0361
UNESCO	y = 1.0219x + 10.942	1.0219
Arnon	y = 1.1142x + 11.952	1.1142
Owen & Axler	y = 0.0011x + 0.0091	0.0011
Lorenzen	y = 0.0011x - 0.0165	0.0011