



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตชุดตรวจสอบ ELISA KIT เชิงพาณิชย์ สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

**Commercial Production of ELISA Kit for Rapid Detection of
Microcystin in Water**

โดย

ดร. วิเชียร ยงมานิตชัยและคณะ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุมภาพันธ์ 2550

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตชุดตรวจสอบ ELISA KIT เชิงพาณิชย์ สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครไซสตินในน้ำ

**Commercial Production of ELISA Kit for Rapid Detection of
Microcystin in Water**

คณบุรีจัย

ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย

นางสุวรรณा กลัดพันธุ์

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร	3
บทคัดย่อ	4
Abstract	6
คำนำ	8
ความเป็นพิษและผลกระทบของสารพิษไม่โครงซิสติน	9
ผลของสารพิษไม่โครงซิสตินต่อสุขอนามัยของคนและสัตว์	10
โครงการสร้างทางเดินและลักษณะจำเพาะของสารพิษไม่โครงซิสติน	11
ความคงดั้งของสารพิษไม่โครงซิสติน	11
การตรวจวิเคราะห์สารพิษไม่โครงซิสติน	12
วัสดุประสงค์ของโครงการ	13
อุปกรณ์และวิธีการ	14
1. ประเมินการใช้ชุด ELISA kit ใน การตรวจหาสารพิษไม่โครงซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติ	14
2. อิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดของชุดตรวจสอบ ELISA kit	16
3. การศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit	17
4. การประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบ ELISA kit ใน การตรวจวัดสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วย LC/MS	18
5. การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการจัดสัมมนาและสาธิตร่วมกับ หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง	19
ผลและวิจารณ์	20
1. ประเมินการใช้ชุด ELISA kit ใน การตรวจหาสารพิษไม่โครงซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติ	20
2. อิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดของชุดตรวจสอบ ELISA kit	24
3. การศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit	53
4. การประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบ ELISA kit ใน การตรวจวัดสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วย LC/MS	70
5. การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการประชุมเชิงปฏิบัติการ	72
6. การปรับปรุงชุดตรวจสอบ ELISA kit ให้มีขนาดกะทัดรัด	74
สรุปผลการทดลอง	75
ภาคผนวก	76
เอกสารอ้างอิง	81

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

สารพิษไมโครซิสตินเป็นสารพิษน้ำสร้างโดยไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis* ที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศไทย มีความเป็นพิษสูงต่อเนื้อเยื่อตับและกระดูกให้เกิดเนื้องอกซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง วิธีวิเคราะห์สารพิษน้ำส่วนใหญ่จะใช้ HPLC ซึ่งมีระดับความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ในการหาปริมาณในระดับที่เป็นอันตรายที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก (1 ppb) โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบสำหรับการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยระหว่างปี พ.ศ. 2545 – 2548 จนได้ชุดต้นแบบสำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษได้ในระดับ 0.2 ppb โดยต้องการเครื่องอ่านค่า ELISA Reader และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb

จากการผลลัพธ์ข้างต้น โครงการนี้จึงมีความประسังค์ที่จะนำชุดต้นแบบนี้ไปใช้ร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่มักประสบปัญหาการปนเปื้อนของสาหร่ายพิษ *Microcystis* ในแหล่งน้ำต่างๆ ได้แก่ การประปาและครุภัณฑ์ การประปาส่วนภูมิภาค สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย โดยวัตถุประสงค์ของโครงการ มีดังนี้

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน

2. เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ ELISA Kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินเชิงพาณิชย์

ซึ่งผลจากการวิจัยสามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง และได้ผลเป็นที่น่าพอใจยิ่ง โดยประสิทธิภาพในการตรวจวัดมีความไวสูงกว่าวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ HPLC เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้โดยตรง (ไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษจากตัวอย่าง ... ปริมาณมากเหมือน HPLC) และสามารถใช้ได้เป็นอย่างดีสำหรับการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำต่างๆ นอกจากนี้ชุดตรวจสอบนี้ยังสามารถใช้ตรวจสารพิษไมโครซิสตินได้ผลเป็นอย่างดี ในตัวอย่างน้ำที่มี pH อยู่ในช่วง 5.5 – 7.5 มีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรต์ไม่เกิน 100 mM หรือ 10 ppt ระดับความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมไม่เกิน 100 mM ระดับความเข้มข้นของเหล็กในรูปออกซิไดซ์ไม่เกิน 10 mM และคลอรีนและฟลูโไฮroxีในระดับปกติไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้ควรบรรจุในถุงพลาสติกภายในโทรศัพท์ และเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส (รวมทั้งน้ำยาอื่นๆ) จะทำให้สามารถรักษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบได้นาน 6 เดือน

เมื่อนำชุดตรวจสอบนี้ไปประเมินระดับของสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำจากระบบการผลิตน้ำประปาพบว่าสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถยืนยันผลจากการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

รหัสโครงการ : RDG4830016

ชื่อโครงการ : การผลิตชุดตรวจสอบ ELISA KIT เชิงพาณิชย์ สำหรับตรวจหาสารพิษ
Microcystin ในน้ำ

ชื่อนักวิจัย : วิเชียร ยงมานิตชัย¹, สุวรรณा กลัดพันธุ์²

¹ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,

² สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail address : fsciwc@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 พฤษภาคม 2548 – 30 เมษายน 2549

บทคัดย่อ

สารพิษไมโครซิสตินเป็นสารพิษที่สร้างโดยไชยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis* ที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศไทย มีความเป็นพิษสูงต่อเนื้อเยื่อตับและกระดูกให้เกิดเนื้องอกซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง วิธีวิเคราะห์สารพิษนี้ส่วนใหญ่จะใช้ HPLC ซึ่งมีระดับความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ในการหาปริมาณในระดับที่เป็นอันตรายที่กำหนดโดยองค์กรอนามัยโลก (1 ppb) โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบสำหรับการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยระหว่างปี พ.ศ. 2545 – 2548 จัดทำชุดต้นแบบสำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจปริมาณสารพิษได้ในระดับ 0.2 ppb โดยต้องการเครื่องอ่านค่า ELISA Reader และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ดีกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์กรอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb วัตถุประสงค์ของโครงการ มีดังนี้

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน

2. เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ ELISA Kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินเชิงพาณิชย์

ซึ่งผลจากการวิจัยสามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง โดยประสิทธิภาพในการตรวจมีความไวสูงกว่าวิธีการดังเดิมที่ใช้ HPLC เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้โดยตรง (ไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษจากตัวอย่างปริมาณมากเหมือน HPLC) จึงสามารถใช้ในการเฝ้าระวังการปะปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำต่างๆ นอกจากนี้ชุดตรวจสอบนี้ยังสามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินได้ผลเป็นอย่างดี ในตัวอย่างน้ำที่มี pH อยู่ในช่วง 5.5 – 7.5

มีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรต์ไม่เกิน 100 mM หรือ 10 ppt ระดับความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมไม่เกิน 100 mM ระดับความเข้มข้นของเหล็กในรูปออกซิไดซ์ไม่เกิน 10 mM และคลอรินและฟลูโอลอเรต์ในระดับปกติไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้ควรบรรจุในถุงพลาสติกภายในตู้เย็น แล้วเก็บไว้ในคูเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส (รวมทั้งน้ำยาอื่นๆ) จะทำให้สามารถตรวจเชิงประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบได้นาน 6 เดือน

เมื่อนำชุดตรวจสอบนี้ไปประเมินระดับของสารพิษไมโครชีสตินในตัวอย่างน้ำจากระบบการผลิตน้ำประปาพบว่าสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถยืนยันผลจากการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

คำสำคัญ : ชุดตรวจสอบอิเล็กทรอนิกส์ไมโครชีสติน โพลีโคนออลแอนดิบอดี ประเทศไทย

Project Code : RDG4830016

Project Title : Commercial Production of ELISA Kit for Rapid Detection of Microcystin in Water

Investigators : Yongmanitchai W.¹ and Cladpan S.²

¹Faculty of Science, Kasetsart University

²Research and Development Institute, Kasetsart University

E-mail address : fsciwc@ku.ac.th

Project Duration : 1 May 2005 – 30 April 2006

Abstract

Microcystin is a hepatotoxic compound that leads to tumor and could develop to cancer cell. It is produced by a cyanobacteria, *Microcystis*, that commonly found in freshwater resources of Thailand. HPLC is the only standard method that used in analysis of this compound, but the sensitivity of the method is insufficient to detect the toxin at the level of 1 ppb which is the guideline recommended in drinking water issued by WHO. This research is the extension of the previous project, Development of ELISA Kit Prototype for Rapid Detection of Microcystin in Water, funded by Thailand Research fund in 2002 – 2004. The kit could detect toxin at the level as low as 0.2 ppb (by ELISA Reader) or at the level of 0.5 ppb (by naked eye). Both levels were far below safety limit recommended by World Health Organization at 1 ppb. The objectives of this project are:

1. To test the efficiency, accuracy and limitation of applying the ELISA kit in detection of microcystin,
2. To produce the ELISA kit for commercial applications.

Results revealed that the ELISA kit could detect microcystin in natural water samples with relatively accurate. The efficiency was much better than HPLC as far as the sensitivity was concerned due to its ability to analyze sample directly without pre-concentration as in the case of HPLC. Therefore, this kit could be used in monitoring of toxin contamination in water resources. This kit could analyze samples in the pH range of 5.5 – 7.5, sodium chloride concentrations less than 100 mM or 10 ppt, calcium salts

concentrations less than 100 mM, iron concentration less than 10 mM and chlorine and fluoride at normal levels did not affect the efficiency of the kit.

This ELISA kit should be packed under nitrogen atmosphere and stored in a refrigerator at 4°C. At this condition the shelf-life could be extended upto 6 months.

When this ELISA kit was tested against water samples collected from tap water production systems, the results were satisfactory as confirmed by LC/MS.

Keywords : ELISA Kit, Microcystin, polyclonal antibody, Thailand

คำนำ

ปัจจุบันไชยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษเป็นปัญหาสำคัญส่งผลกระทบต่อความเจ็บป่วยของมนุษย์และการตายของสัตว์เลี้ยงหลายแห่งทั่วโลก เช่น การปนเปื้อนของไชยาโนแบคทีเรียนในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ในประเทศไทย (อาภารัตน์และคณะ 2542) การเกิดโรคดับอักเสบระนาดอย่างรุนแรงในประชากรใน Palm Island รัฐ Queens Island ประเทศออสเตรเลีย (Baurke และคณะ, 1983) การเกิดมะเร็งดับระยะเริ่มต้น ของประชากรในประเทศจีน (Delong, 1979 และ Yu, 1989) เป็นต้น ซึ่งไชยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษนี้ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Microcystis* และ *Nodularia* โดยสามารถเจริญเติบโตรวดเร็วในแหล่งน้ำจืดทั่วไป และจะปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่นำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งมีผลกระทบต่อนิเวศวิทยาอย่างกว้างขวาง

ปัญหานำการปนเปื้อนของไชยาโนแบคทีเรียที่สารพิษดังกล่าวในแหล่งน้ำจืดเป็นปัญหาใหม่ที่หน่วยงานต่างๆ กำลังให้ความสนใจและเร่งดำเนินการแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตน้ำเพื่อการบริโภคให้ปลอดจากสารพิษเป็นปัญหาสำคัญอันหนึ่งที่จำเป็นต้องเร่งศึกษา เนื่องจากสารพิษถูกกำจัดได้ยากในกระบวนการทำการผลิตน้ำประปา มีรายงานว่าสามารถตรวจพบสารพิษไม่ครบทั้งหมดจากไชยาโนแบคทีเรียนได้ในน้ำประปาของประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย ด้วยการใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC, ELISA และทดสอบความเป็นพิษกับหนู (Chorus and Bartram, 1999) ซึ่งองค์การอนามัยโลก (WHO, 1997) จึงได้มีข้อกำหนดค่าความปลอดภัยสำหรับการปนเปื้อนของสารพิษ microsystin LR and equivalent ได้ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมตอลิตรในน้ำดื่ม

สำหรับข้อมูลในประเทศไทยพบว่าไชยาโนแบคทีเรียผลิตสารพิษสายพันธุ์ที่สำคัญ (dominant species) เป็นไชยาโนแบคทีเรียนในกลุ่ม *Microcystis aeruginosa* โดยตรวจพบในแหล่งน้ำจาก 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำจากเขื่อนแม่กวาง จังหวัดเชียงใหม่ เขื่อนลำดะ Kong จังหวัดนราธิวาส แม่น้ำกืนน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี และสระบัวเสี้ยงเป็ดหน้า เรือนจำคลองเปรมกรุงเทพฯ และยังได้สรุปว่าแหล่งน้ำภายในประเทศไทยจะเป็นแหล่งที่มีการปนเปื้อนของไชยาโนแบคทีเรียนน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ ทั้งแหล่งน้ำที่ใช้เพื่อการเกษตร อุปโภค-บริโภค และเพื่อการพักผ่อน

จากปัญหานำการปนเปื้อนของสารพิษนี้แนวทางหนึ่งที่จัดช่วยเหลือเหลือการใช้น้ำที่มีสารพิษ ปนเปื้อน คือการหาวิธีตรวจที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำในแหล่งน้ำต่างๆ ที่ผ่านมาการวิเคราะห์หาสารพิษกลุ่มนี้จะใช้เทคนิคทาง HPLC ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษหลัก (*microcystin-LR, -RR และ -YR*) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีความไวไม่เพียงพอในการนับที่ตัวอย่างน้ำมีการปนเปื้อนระดับต่ำ อีกทั้งเครื่องมือมีราคาแพง และต้องใช้ผู้ตรวจวิเคราะห์ที่มีความชำนาญ จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษ ELISA เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสามารถตรวจหาสารพิษได้ครอบคลุมกว้างขวาง มีความไว

สูง ไม่เจาะจงชนิดของไมโครซิสตินที่มีอยู่มากชนิด และยังสะดวกในการตรวจหาสารพิษจากตัวอย่างจำนวนมาก จึงเป็นข้อดีอย่างยิ่งในการช่วยตรวจหาสารพิษในระเบปฐมภูมิ ปัจจุบันบริษัทในต่างประเทศได้ผลิต ELISA KIT ขายในราคา KIT ละ 396 เหรียญดอลลาร์สหรัฐ ราคาต่อตัวอย่างคิดเป็น 9 เหรียญ ซึ่งเป็นราคาวิเคราะห์ต่อตัวอย่างที่ค่อนข้างสูงมากอีกทั้งน้ำมีความจำเพาะต่อตัวอย่างในประเทศสหรัฐอเมริกา (Anonymous, 2001)

เมื่อปี พ.ศ. 2545 คณะผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจาก ฝ่ายสวัสดิภาพสาธารณะ (ฝ่าย 3) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ในโครงการวิจัย “การพัฒนา ELISA kit ดันแบบเพื่อใช้ตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ” และประสบความสำเร็จในการผลิตชุดตรวจวิเคราะห์ดันแบบที่มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับที่ผลิตขายโดยประเทศทางตะวันตก และสามารถตรวจดับปริมาณสารพิษในน้ำที่มีปริมาณเพียง 0.2 ppb และให้ผลความแม่นยำมากกว่า 90% ดังนั้นในการผลิตชุดตรวจสอบเชิงพาณิชย์ โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักในการนำเทคโนโลยีที่ได้พัฒนาขึ้นมา สำหรับผลิตชุดตรวจสอบเพื่อใช้ในประเทศไทย โดยหน่วยงานต่างๆ ทั้งภาครัฐ เอกชน และองค์กรบริหารส่วนท้องถิ่น ให้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำที่ใช้ในการอุปโภค-บริโภคได้

ความเป็นพิษและผลกระทบของ Microcystin

การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย ในแหล่งน้ำก่อให้เกิดผลกระทบอย่างกว้างขวางทั้งทางสิ่งแวดล้อม สังคม เศรษฐกิจ กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ตัวอยู่บนผิวน้ำ นอกจากจะทำให้ทัศนียภาพโดยรวมด้อยลงแล้ว ยังทำให้รสมองน้ำดีมีที่ผ่านการบำบัดแล้วเปลี่ยนไปอีกด้วย การย่อยสลายของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจำนวนมาก ทำให้ปริมาณของออกซิเจนในน้ำลดน้อยลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำ และก่อให้เกิดผลกระทบต่อความสามารถในการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำต่างๆ ได้ ที่น่าเป็นห่วงที่สุดในแขวงสุขอนามัยของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงก็คือ การผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นพิษอย่างสูง ซึ่งสารทุติยภูมิเหล่านี้มีทั้งชนิดที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxin) และชนิดที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (biotoxin) (Carmichael, 1992) สารพิษกลุ่มดังกล่าวนั้นจะประกอบด้วยสาร alkaloid ที่เป็นพิษต่อระบบประสาท เช่น anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin และสารพิษที่ทำให้สัตว์น้ำชนิดมีเปลือกเกิดอาการอัมพาต โดยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อตับในสัตว์ชนิดสูงที่พบเห็นได้บ่อย เช่น microcystins และ nodularins เป็นสารพิษ cyclic peptide ส่วนสารพิษ cylindrospermopsin เป็นสารพิษ alkaloid (Anderson และคณะ, 1993)

สารพิษไมโครซิสตินนั้นถูกสร้างโดย cyanobacteria ทั้งชนิดที่เป็นเส้นสาย (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, และ *Hapalosiphon*) หรือชนิดที่เป็นกลุ่มโคลน้อย่าง *Microcystis* เป็นดัน นอกจากนี้ยังได้มีการค้นพบสารที่มีโครงสร้างคล้ายไมโครซิสตินในแหล่งน้ำทะเล (Anderson และคณะ, 1993) แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของจุลชีพที่สร้างสารพิษนี้

ผลของสารพิษไมโครซิสตินต่อสุขอนามัยของคนและสัตว์

จากการรวมหลักฐานการเจ็บป่วยของคนที่ได้รับสารพิษจาก cyanobacteria โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสารไมโครซิสตินการสัมผัสกับสารพิษนั้น ส่วนใหญ่เกิดจากการห่อห้องเที่ยวตามทะเลสาบและแม่น้ำ (การสัมผัสทางปากและทางผิวน้ำ) การดื่มน้ำหรือกินอาหารเสริมที่สกัดจากไชยano แบนค์เรีย (การสัมผัสทางปาก) และการใช้ห่อฝึกน้ำอ่อนน้ำ (การสัมผัสทางการสูดดม) ระยะเวลาที่ร่างกายจะมีโอกาสสัมผัสกับสารพิษนั้นจะขึ้นอยู่กับที่ตั้ง ทางภูมิศาสตร์ของสถานที่ (3-5 เดือนในหนึ่งปีสำหรับประเทศไทยและเมริกาและแคนาดา จนถึง 6-10 เดือนสำหรับประเทศออสเตรเลียและสหภาพยุโรปได้) ประเทศไทยได้มีการศึกษาทางระบบวิทยาที่อาจพบความสัมพันธ์ระหว่างอุบัติการณ์ของการเกิดโรคระบาดเรื้อรังกับการได้รับสารอาหาร และน้ำดื่มที่ปนเปื้อนสารพิษของ cyanobacteria (Falconer และคณะ, 1994)

การวิจัยทางด้านระบบวิทยาที่กระทำการอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายปีในประเทศไทยได้แสดงให้เห็นว่าอุบัติการณ์ของโรคระบาดเรื้อรังตั้งในมนุษย์นั้นแท้จริงมีส่วนเกี่ยวข้องกับแหล่งของน้ำดื่มโดยที่น้ำจากข้อมูลว่า ในกลุ่มประชากรชนบทที่ดื่มน้ำจากแหล่งน้ำบนผิวดินจะมีโอกาสเป็นโรคระบาดได้มากกว่ากลุ่มที่ดื่มน้ำจากน้ำอ่อนน้ำ (Yn, 1989) การศึกษาของ Carmichael (1992) ได้ตั้งข้อสังเกตไว้ว่า ความสัมพันธ์นี้อาจจะสืบเนื่องมาจากการที่แหล่งน้ำดื่มน้ำบนผิวดินมีการปนเปื้อนของ cyanobacteria ซึ่งความเกี่ยวพันกันของข้อมูลนั้นได้มาจากการศึกษาผลทางชีวภาพของสารไมโครซิสติน ผู้ที่ได้รับสารพิษจาก cyanobacteria จะมีอาการระคายเคืองตาและผิวน้ำ อาการไข้ มีน้ำเหลือง เหนื่อยง่าย และกระเพาะลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ซึ่งอาการเจ็บปายที่กล่าวมาไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าเกิดขึ้นจากสารพิษจำพวก hepatotoxins หรือ neurotoxins

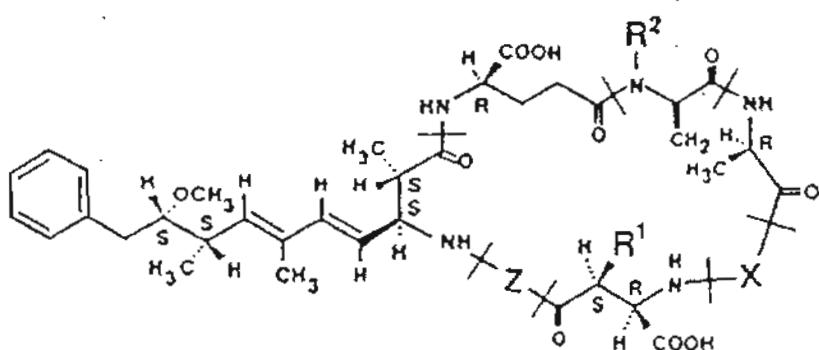
การตายและการเจ็บปายของ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และปลา รวมทั้งนก เป็นอุบัติการณ์ที่สำคัญมาก ประมาณ 90% ของความเข้มข้นที่เป็นอันตรายถึงชีวิตลงไป กลับไม่ปรากฏผลที่เจริญเต็มที่ในสัตว์ ขนาดและชนิดของสัตว์มีส่วนในการทำลายความเป็นพิษของสารที่กลืนกินลงไปภายใต้การหายใจ โดยปกติพบว่า สัตว์ที่มีระบบเดินหายใจสามารถต้านทานสารพิษได้ดีกว่าสัตว์ที่มีส่องกระเพาะ สาเหตุการตายของหนูที่ได้รับสารพิษนั้นเกิดจากการห้อคเนื่องจากเลือดไหลไม่หยุดและตืบภายใน (Theiss และคณะ, 1988)

Falconer และคณะ (1988) ได้ทำการทดลองให้หนูดื่มน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสารสกัดจากเชื้อ *Microcystis aeruginosa* ในขนาดความเข้มข้นที่ต่ำกว่า lethal concentration เป็นเวลาติดต่อกันนาน 1 ปี ผลการศึกษาสรุปได้ว่า หนูที่ดื่มน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษจะมีอัตราการตายสูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับสารพิษ และหนูเพศผู้จะมีอัตราการตายสูงกว่าหนูเพศเมีย นอกจากนี้ หนูที่ได้รับสารพิษแบบเรื้อรังยังมีการเกิดโรคปอดบวมสูงขึ้นตามอายุอีกด้วย

นอกจากนี้ไมโครซิสตินมีความคงทนต่อสภาพพื้นที่ เช่นกรดเท่ากับ 2-4 และทนต่อความร้อน ดังนั้นความเข้มข้นของสารพิษในแหล่งน้ำจึงอาจสะสมเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลาในแหล่งน้ำได้นาน (Fitzgeorge และคณะ, 1994)

โครงสร้างทางเคมีและลักษณะจำเพาะของสารพิษไมโครซิสติน

Botes และคณะ (1982) พนว่าไมโครซิสตินมีโครงสร้างเป็นวงแหวนวงเดี่ยวที่ประกอบขึ้นจากการดอะมิโนมาตรฐาน 5 ตัวและการดอะมิโนพิเศษ 2 ตัว การดอะมิโนมาตรฐาน 5 ตัวนี้แบ่งออกเป็นการดอะมิโนที่มีอยู่ในไมโครซิสตินทุกชนิดจำนวน 3 ตัวได้แก่ D-alanine (Ala), erythro- β -methylaspartic acid (β -Me-Asp), และ γ -linked glutamic acid (Gln) และการดอะมิโนคู่ที่แตกต่างออกไปตามชนิดของสารพิษอีกจำนวน 2 ตัว ซึ่งเท่าที่มีการค้นพบมีจำนวนมากกว่า 50 ชนิด แต่ที่พนบอยมีอยู่ 3 ชนิด คือ arginine และ arginine (RR), leucine และ arginine (RR), tyrosine และ arginine (YR) สำหรับการดอะมิโนพิเศษทั้ง 2 ตัวนั้น ได้แก่ 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2, 6, 8, - trimethyldeca-4, 6-dienoic acid (Adda) และ N-methyldehydroalanine (Mdha)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารพิษไมโครซิสติน Cyclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷)

ความคงตัวของสารพิษไมโครซิสติน

สารพิษในกลุ่มไมโครซิสตินเป็นสารประกอบจำพวก heptapeptide ชนิดวงแหวนที่เสถียรต่อปฏิกิริยาเคมีสูง โดยสารพิษนี้จะมีครึ่งชีวิตประมาณ 3 สัปดาห์ภายใต้สภาวะที่พื้อเช่ากับ 1 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การทำลายสารพิษนี้อย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องใช้การกลั่นด้วยกรดที่มีฤทธิ์กร่อนสูงมาก เช่น 6N hydrochloric acid หรือ trifluoroacetic acid และสารกลุ่มนี้ยังทนต่อการย่อยลายของเอนไซม์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปอย่างเช่น trypsin ได้มีการศึกษาถึงการสลายตัวของสารไมโครซิสตินด้วยรังสี โดยใช้แสง fluorescence และแสงอาทิตย์ ผลการทดลองพนว่ารังสีไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการสลายตัวของสารนี้ เมื่อตั้งสารละลายของสารนี้ในน้ำกลันบริสุทธิ์ทึ้งไวนาน 26 วัน และตั้งสารละลายของสารพิษนี้ในน้ำที่มีส่วนผสมของรงค์วัดฤทธิ์ในเซลล์ของไขยานแบบคีเรย์ เช่น chlorophyll a, β -carotene, และ phycocyanins ภายใต้แสงอาทิตย์เป็นเวลานาน 15 วัน พบร่วมกันของไมโครซิสตินจะลดลง และคงว่ารังค์วัดฤทธิ์เหล่านี้มีส่วนสำคัญในการ

เร่งปฏิกริยาการสลายตัวของไมโครซิสตินแล้วการทดลองทำนองเดียวกันนี้โดยใช้แสง fluorescence กับสาร microcystin-LR พบว่าแสงไม่มีผลต่อการสลายตัวแต่ประการใด

จากการศึกษาผลของรังควัดถูกที่มีต่อการเกิด isomerization สรุปได้ว่า ในสภาวะแวดล้อม ความชื้นในอากาศ กระบวนการสลายตัวด้วยแสงและกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงเรขาคณิต ของสารให้กล้ายเป็นสารที่ไม่มีพิษจะเกิดขึ้นพร้อมๆกัน การสลายตัวจะเกิดขึ้นเร็วกว่าหากมีความ เข้มข้นของรังควัดถูกสูง นอกจากนี้รังควัดถูกยังส่งผลต่อการเกิด isomerization ของสาร โดยที่อัตรา การเกิด isomerization จะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของรังควัดถูก (Tsujii และคณะ, 1994)

การตรวจวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสติน

1. Thin Layer Chromatography (TLC)

การใช้เทคนิค TLC ทั้งประเภท normal phase และ reversed phase ในการสกัดและทำให้สารพิษที่เป็นสายเปปไทด์บริสุทธิ์ขึ้นนั้นเป็นสิ่งที่ไม่ยุ่งยากและไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่ลับ ซับซ้อน และทั้งสองวิธีนี้จะใช้ตัวทำละลายผสม chloroform-methanol-water เป็น mobile phase (Al-Lay และคณะ, 1988) การใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบบนอยู่ด้วยนั้นมีข้อดีก ประการหนึ่งคือ น้ำจะช่วยลดการทำงานของสารประกอบจำพวก silanols บนผิวของแผ่น TLC สำหรับสารไมโครซิสตินนั้น พนว่าสามารถใช้ระบบตัวทำละลายผสม 2 ระบบด้วยกันคือ chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน (4 : 6 : 1) และ ethyl acetate-isopropanol-water ใน อัตราส่วน (4 : 3 : 7) (Harada และคณะ, 1988) ซึ่งระบบตัวทำละลายผสมชนิดหลังนี้ใช้ในการแยก desmethylated microcystin-LR (Harada และคณะ, 1991) นอกจากนี้ยังมีการใช้ระบบตัวทำละลาย ผสมอีกระบบหนึ่งคือ *n*-butanol-acetic acid-water เป็น mobile phase นอกจากนี้จากการใช้ chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน (4 : 6 : 1) ในการแยก microcystin-YR และ microcystin-LR ด้วย normal phase TLC (Kungswan และคณะ, 1988) และในปัจจุบันมีการพัฒนา เทคนิค TLC ให้สามารถแยกสารพิษไมโครซิสตินให้บริสุทธิ์มากขึ้นกว่าเดิมโดยใช้เทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) หลักการคือ ใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วยซิลิ กาเจลที่มีขนาดอนุภาคที่ละเอียดมาก ใช้สารละลายเคลื่อนที่เป็น chloroform-methanol-water ใน อัตราส่วน (4 : 6 : 1) และตรวจดูสารพิษภายใต้แสงอุลติวาร์โอดิเจต

2. Gas Chromatography (GC)

เทคนิคการวิเคราะห์หาไมโครซิสตินด้วยการใช้ gas chromatography นั้นสามารถใช้ วิเคราะห์หาปริมาณของไมโครซิสตินทั้งหมดในสารตัวอย่างได้เท่านั้น เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ Adda ตัวหนึ่งคือ 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) (Tanaka และคณะ, 1993) เทคนิคใหม่ล่าสุดที่มีผู้นำมาใช้วิเคราะห์หาไมโครซิสตินคือ capillary zone electrophoresis และตรวจด้วย laser fluorescence (Wright และคณะ, 1989)

3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินโดยใช้วิธี reversed phase HPLC ในการคัดแยกและทำให้สารพิษบริสุทธิ์ขึ้น เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณของไมโครซิสตินเซลล์ที่ผ่านการ lyophilized (Birk และคณะ, 1988) หลังจากที่สารพิษผ่านการขัดสิ่งที่ไม่ดองกรอกแล้ว นำมาแยกส่วนของสารพิษด้วย ODS siliga gel โดยใช้ 26%acetonitrile ต่อ 10mM ammonium acetate เป็นสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) (Krishnamurthy และคณะ, 1986) และแม้วิธีการนี้จะถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางก็ตาม แต่ก็พบว่าไม่สามารถแยก microcystin-LR และ -YR ออกจากกันได้ (Harada และคณะ, 1988) จากการศึกษาต่อมานพบว่าการใช้สารละลายเคลื่อนที่เป็น methanol ต่อ 0.1%TFA จะสามารถแยกไมโครซิสตินทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้ (Kungswan และคณะ, 1987) ในระเบดต่อมามีการพัฒนาการใช้ระบบสารละลายเคลื่อนที่แบบผสมของ methanol ต่อ 0.05%TFA, methanol ต่อ 0.05M-phosphate buffer pH3 ในอัตราส่วน (60 : 40), และ methanol ต่อ 0.05M sodium sulfate โดยใช้ ODS column และใช้ UV detector ในการตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษ ที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายน้ำมาตรฐานทำให้การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Harada และคณะ, 1988)

4. การตรวจวัดโดยเทคนิค ELISA

การใช้เทคนิคด้าน ELISA มาใช้ตรวจวัดปริมาณของสารพิษไมโครซิสตินนับว่าเป็นวิธีที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดในกรณีที่ต้องการตรวจสอบหาสารพิษในสารตัวอย่างจำนวนมากอย่างรวดเร็วเนื่องจากวิธีการนี้มีความไว ความจำเพาะ และความสะดวก (Chu, et al, 1989; Chu, et al, 1990) Kfir และคณะ (1986) เป็นผู้บุกเบิกการใช้ ELISA ในการตรวจสารพิษไมโครซิสตินโดยการใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ microcystin-LA

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน
- เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินเชิงพาณิชย์

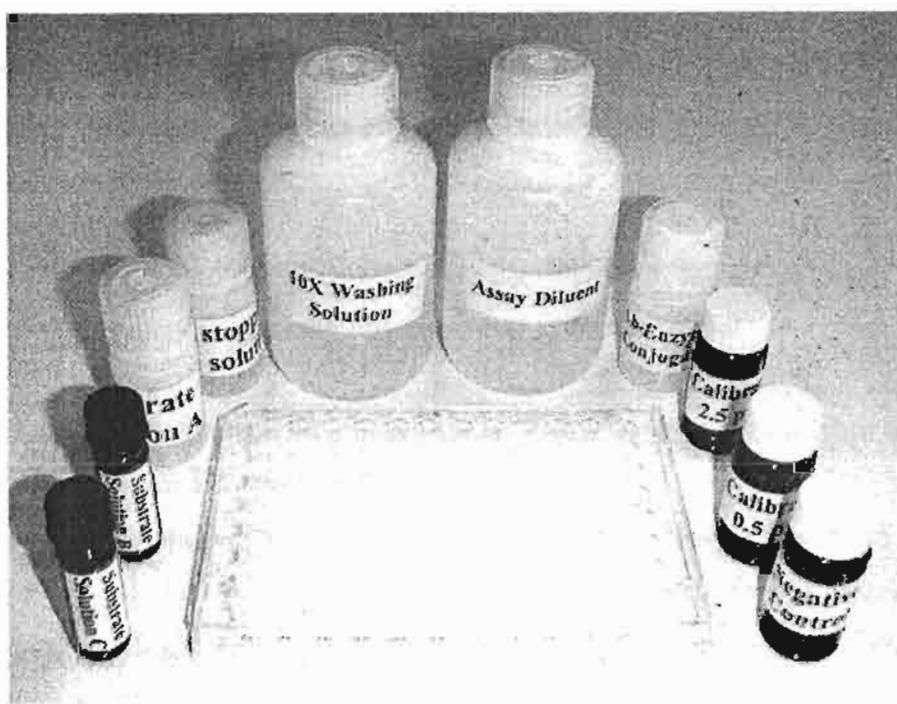
อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประเมินการใช้ชุด ELISA kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติ

1.1 การตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำด้วย ELISA kit

1.1.1 ส่วนประกอบของชุดตรวจสอน (ภาพที่ 2)

1. Antibody-coated micro-well plate
2. Negative Control
3. 0.2, 1 และ 5 ppb Microcystin RR calibrator
4. Assay diluent
5. Antibody-enzyme conjugate
6. 10X Wash salt solution
7. Substrate A, B and C (เตรียม substrate mixture ในอัตราส่วน A:B:C = 10 มิลลิลิตร : 100 ไมโครลิตร : 7 ไมโครลิตร ก่อนใช้งาน หลังผ่านแล้วมีอายุการเก็บ 1 ชั่วโมง)
8. Stop solution



ภาพที่ 2 แสดงส่วนประกอบของชุดต้นแบบ ELISA kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

1.1.2 วิธีการ

1. เตรียมสารละลายน้ำและอุปกรณ์ทั้งหมดให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน และอยู่ที่อุณหภูมิห้อง
2. เดิม negative control หรือ calibrator หรือ ตัวอย่างน้ำ (จำนวนชั้น $n \geq 12$) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (ถ้าตัวอย่างน้ำมีปริมาณสารพิษสูงเกินไป ให้เจือจางด้วย assay diluent)
3. เดิม antibody-enzyme conjugate ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
4. ผสมสารละลายน้ำใน micro-well plate ด้วยการหมุนในแนวราบเป็นวงกลม ประมาณ 20-30 วินาที
5. ปิดฝ่า micro-well plate และบ่มในที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
6. เทสารละลายทึบในอย่างน้ำ หรือภาชนะที่เหมาะสม
7. เดิม wash solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม และดูดทิ้ง ทำทั้งหมด 3 ครั้ง
8. เดิม substrate mixture ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ในที่มีดีจะได้สารละลายสีฟ้าเกิดขึ้น
9. เดิม stop solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จะได้สารละลายสีเหลืองเกิดขึ้น
10. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA Reader
11. คำนวณปริมาณสารพิษจาก $\%B/B_0$ ดังนี้

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Average Absorbance of Calibrator or Sample}}{\text{Average Absorbance of Negative Control}} \times 100$$

ค่า $\%B/B_0$ นี้เป็นค่าที่สมพาร์ท (relative value) ที่ค่อนข้างคงที่ เนื่องจากเป็นค่าที่คำนวณเบริญเทียบกับ calibrator ในทุกชุดของการตรวจวัด

ซึ่งในการตรวจวัดแต่ละครั้งจะต้องทำการฟมาตรฐานจาก calibrator ที่เตรียมไว้ (0.2, 1 และ 5 ppb) หลังจากนั้นจึงทำการคำนวณ โดย plot ค่า log ของความเข้มข้นของ calibrator แกน x และค่า $\%B/B_0$ บนแกน y ซึ่งถ้าค่า $\%B/B_0$ เมื่อเทียบแล้วได้มากกว่า 5 ppb ควรจะเจือจางตัวอย่างให้ปริมาณสารพิษอยู่ระหว่าง 0.2 – 5 ppb และทำการตรวจวัดใหม่

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง HPLC

1.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 20 ลิตรด้วยการกรองผ่านแผ่นไนลอนที่มีรูขนาดความกว้าง 200 mesh เมื่อถึงที่พักในวันเดียวกันทำการกรองหยาดด้วย filter press ที่สามารถ

กรองได้ระดับ 1 ไมโครเมตร หลังจากนั้นกรองละเอียดด้วย membrane filter (Satorius, AG Germany) ที่มีขนาดของรู 0.45 ไมโครเมตร

1.2.2 การสกัดสารพิษไมโครซิสติน

นำน้ำที่ผ่านการกรองจากข้อ 1.2.1 ปริมาณ 10 ลิตร มากรองข้าวอีกครั้งด้วย membrane filter (Satorius, AG Germany) ที่มีขนาดของรู 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้นผ่านน้ำทึบหมุดไปยัง C₁₈ cartridge (Sep-pak, Millipore, Waters Associates) ที่จะทำการดูดซับสารพิษเอาไว้ภายใน cartridge (ก่อนนำ cartridge มาใช้ทำการล้างด้วยเมธanol 100 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามด้วยนำก้อน 10 มิลลิลิตร) โดยในแต่ละวันอย่างจะใช้ประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารพิษทึบหมุดออกมาด้วย methanol นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง แล้วนำสารพิษออกด้วย 20% methanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ผ่าน Sep-pak C₁₈ อีกครั้ง แล้วนำสารพิษออกด้วย 20% methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในส่วนนี้จะได้ microcystin-RR และสารพิษส่วนที่เหลือ (microcystin-LR และ microcystin-YR) ด้วย 100 % methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละส่วนไปทำการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภายใต้สูญญากาศ) จะเหลือตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้มารองผ่านตัวกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Perkin Elmer, Connecticut, USA) ที่ประกอบด้วย LC pump (Series 200) และ programmable absorbance detector model 785 A โดยฉีดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผ่าน HPLC คอลัมน์ Mightysil ODS (RP-18GP 150-4.6, Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan) ใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย เมธanol ต่อฟอสฟอตบัพเพอร์ 0.05 มอล ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 (v/v) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ ตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษ ด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร โดยเทียบระยะเวลาคงตัว (retention time) และ พื้นที่ได้ peak กับสารพิษมาตรฐาน (Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan)

2. อิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดของชุดตรวจสอบ ELISA kit

2.1 ผลของ pH

ทำการปรับ pH ของน้ำบริสุทธิ์ให้มีค่า 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N หรือ สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N และใช้เป็นตัวอย่างน้ำสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.2 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ปรับปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl; MW 58.44) ในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 mM และใช้เป็นตัวอย่างน้ำสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.3 ผลของเกลือแมกนีเซียม

ทำการปรับปริมาณของเกลือแมกนีเซียมชัลเฟต ($MgSO_4$; MW 102.4) ในน้ำบริสุทธิ์ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 mM แล้วใช้เป็นตัวอย่างน้ำสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.4 ผลของเกลือแคลเซียม

ปรับปริมาณของเกลือแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$; MW 100.1) ในน้ำบริสุทธิ์ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 300 mM แล้วใช้เป็นตัวอย่างน้ำสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.5 ผลของเหล็ก

ปรับปริมาณของเกลือเฟอรัสชัลเฟต $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; MW 278.0) หรือ เฟอริกชัลเฟต $[Fe_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$; MW 399.9) ในน้ำบริสุทธิ์ให้มีระดับความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 30 mM แล้วใช้เป็นตัวอย่างน้ำสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.6 ผลของคลอริน

ปรับปริมาณของคลอรินที่แตกตัวมาจากโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ($NaOCl_2$; MW 100.1) ในน้ำบริสุทธิ์ให้มีระดับความเข้มข้นของคลอรินเท่ากับ 1, 2, 5, 10 และ 15 ppm แล้วใช้เป็นตัวอย่างน้ำสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.7 ผลของฟลูโอไรด์

ปรับปริมาณของเกลือฟลูโอไรด์ (NaF ; MW 278.0) ในน้ำบริสุทธิ์ให้มีระดับความเข้มข้นของฟลูโอไรด์เท่ากับ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ppm แล้วใช้เป็นตัวอย่างน้ำสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

3. การศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit

นำ antibody-coated micro-well plate ที่ต้องการศึกษามาบรรจุในถุงพลาสติกพอลีไพรีลิน ที่มีความหนา 150 ไมโครเมตร ขนาด 3×6 นิ้ว แล้วผนึกปากถุงด้วยจุ่ร้อนภายใต้สภาวะ

3.1 ปกติ (normal pack)

3.2 สูญญากาศ (vacuum pack) โดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (Gast, model 0523-V4-G21DX, USA) ที่ระดับสูญญากาศ 60 มิลลิบาร์

3.3 บรรจุภัณฑ์ไนโตรเจน (nitrogen pack)

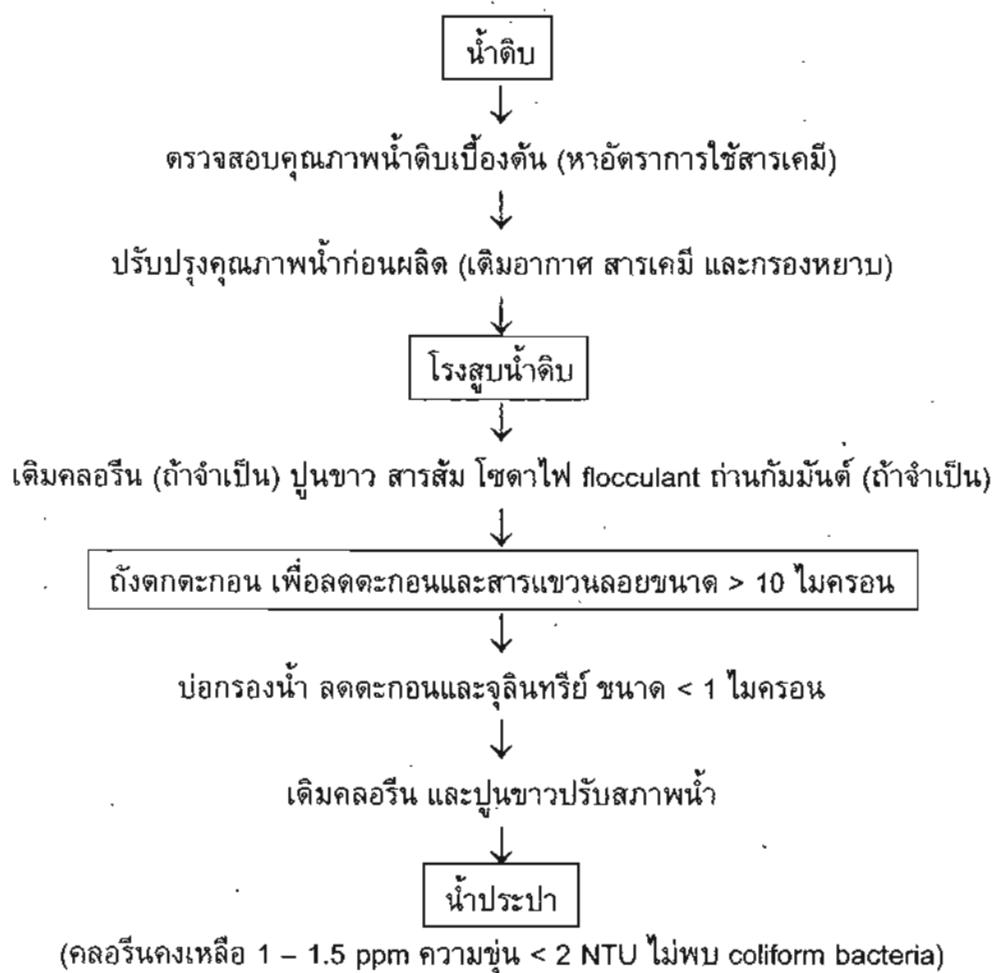
แบ่งชุดตรวจสอบที่บรรจุทั้ง 3 แบบ พร้อมนำยาและอุปกรณ์อื่นๆ ออกเป็น 2 ส่วน แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิห้อง) และคุ้บบ่ม 4 องศาเซลเซียส

ทำการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่เตรียมข้างต้นตามระยะเวลาที่กำหนด ได้แก่ อายุ 0, 1, 2, 3 และ 6 เดือน

4. การประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากระบบผลิตน้ำประปา ตามจุดต่างๆ ดังนี้

1. น้ำดิบ
2. โรงสูบน้ำดิบ
3. ถังตักตะกอน
4. น้ำประปา



ภาพที่ 3 กรรมวิธีการผลิตน้ำประปา

ที่มา : การประปานครหลวง (http://www.mwa.co.th/treat_water.html)

4.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 1 ลิตร แล้วกรองผ่าน glass fiber filter (GF/F, Whatman) เก็บในขวดพลาสติก และแช่เย็นในถังน้ำแข็งระหว่างเดินทาง

4.2 การสกัดสารพิษไมโครชิสติน

นำน้ำที่ผ่านการกรองจากข้อ 4.1 มากรองข้า้ออกรองด้วย membrane filter (Satorius, AG Germany) ที่มีขนาดของรู 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้นผ่านน้ำทึบหมดไปยัง C₁₈ SPE cartridge (Sep-pak, Millipore, Waters Associates) ที่จะทำการดูดซับสารพิษเอาไว้ภายใน cartridge จากนั้นล้างด้วยน้ำ 1 มิลลิลิตร ตามด้วย 20% methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารพิษออกมาด้วย 80% methanol 0.4 มิลลิลิตร และล้างด้วยน้ำอีก 0.6 มิลลิลิตร นำทั้ง 2 ส่วนมารวมกันจะเป็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.3 การวิเคราะห์สารพิษไมโครชิสตินด้วย LC/MS

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษไมโครชิสตินในตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.2 ด้วยเครื่อง LC/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan) ที่ประกอบด้วย LC pump (LC-10AD) โดยฉีดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ด้วย Autosampler (SIL-HT) ผ่านคอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 x 150 mm, Agilent, USA) เก็บอยู่ใน column oven (CTO-10A) ใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วยเมธานอล :น้ำที่มี formic acid 0.1% ในอัตราส่วน 55 ต่อ 45 (v/v) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ ตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษ ด้วย photo-diode array (SPD – M10A) และ LC/MS – 2010A ใน SIM (selected ion monitor) mode โดยเทียบระยะเวลาคงตัว (retention time) และ พื้นที่ใต้ peak กับสารพิษมาตรฐาน (Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan)

4.4 การวิเคราะห์สารพิษไมโครชิสตินด้วย ELISA kit

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษไมโครชิสตินในตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.2 ด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1

5. การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการจัดสัมมนาและสาธิตร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

ทำการจัดประชุมเชิงปฏิบัติการการใช้ชุดตรวจสอน ELISA kit ให้กับบุคลากรของหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การประปาศรีราชา การประปาส่วนภูมิภาค สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ซึ่งได้แจ้งให้ผู้เข้าร่วมประชุมนำตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจสอบมาใช้ในการวิเคราะห์ระหว่างการประชุม

ผลและวิจารณ์

1. ประเมินการใช้ชุด ELISA kit ในการตรวจหาสารพิษไม่โครงสร้างในแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการใช้ชุดตรวจสอบในการตรวจหาสารพิษไม่โครงสร้างจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ที่ประกอบด้วยตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยา 9 แห่ง จากอ่างเก็บน้ำขนาดกลาง 7 แห่ง และบึงหรือบ่อขนาดเล็ก 4 แห่ง พนว่าจากตัวอย่างน้ำ 9 เขื่อน เมื่อตรวจด้วยชุดตรวจสอบ มี 2 แห่ง คือเขื่อนแก่งกระจาน จ.เพชรบุรี และเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ มีระดับของสารพิษไม่โครงสร้างมากกว่าเกณฑ์มาตรฐานขององค์กรอนามัยโลก (ไม่เกิน 1 ppb) คือมีปริมาณสารพิษอยู่ 4.81 และ 4.56 ppb ตามลำดับ แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยการใช้ตัวอย่างน้ำ 2 – 10 ลิตร พนว่ามีปริมาณสารพิษ 3.24 และ 2.35 ppb ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าผลจากการตรวจด้วยชุดตรวจสอบมีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่มีราคาแพงมาก ค่าใช้จ่ายในการสกัดตัวอย่างสูง ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างนาน (ประมาณ 6 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามบังคับนี้การวิเคราะห์เชิงปริมาณยังด้องใช้ HPLC เป็นหลัก เนื่องจากมีความแม่นยำและ方便เชื่อถือมากกว่าเทคนิคทาง ELISA โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดตรวจสอบที่ใช้พัฒนามาจาก polyclonal antibody ที่รายงานผลเป็นปริมาณสารพิษรวมซึ่งไม่สามารถระบุชนิดของสารพิษที่มีมากกว่า 70 ชนิดได้ ในขณะที่วิธี HPLC สามารถจำแนกสารพิษเป็นชนิดได้ ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าสารพิษไม่โครงสร้างจากเขื่อนห้วยสองแห่งมีส่วนประกอบที่ค่อนข้างแตกต่างกัน โดยสารพิษจากเขื่อนแก่งกระจานจะมี Microcystin-YR ในสัดส่วนที่มากกว่า Microcystin-RR ในขณะที่สารพิษในตัวอย่างน้ำจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์เกือบหันหมดเป็น Microcystin-RR (ตารางที่ 1)

สำหรับตัวอย่างน้ำจากเขื่อนอีก 7 แห่งมีปริมาณสารพิษไม่โครงสร้างมากกว่าเกณฑ์ขององค์กรอนามัยโลกเมื่อตรวจด้วยชุดตรวจสอบ โดยมีปริมาณสารพิษอยู่ระหว่าง 0.08 – 0.791 ppb และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีเพียงตัวอย่างน้ำจากเขื่อนภูมิพล และเขื่อนแม่กวงอุดมราษฎร์ที่พบสารพิษในปริมาณน้อยมากเพียง 0.57 และ 0.24 ppb ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างน้ำจากอีก 5 เขื่อน ตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษด้วย HPLC (ตารางที่ 1)

สำหรับตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำขนาดกลาง มี 2 แห่งที่พบว่ามีปริมาณสารพิษมากกว่า 1 ppb เมื่อตรวจด้วย ELISA kit ได้แก่ อ่างเก็บน้ำหมายเลข 1 ของ กฟภ. จังหวัดกรุงเทพมหานคร และอ่างเก็บน้ำห้วยชัยเหล็ก พนบสารพิษไม่โครงสร้าง 2.52 และ 4.41 ppb ตามลำดับ ที่น่าเป็นห่วงคืออ่างเก็บน้ำห้วยชัยเหล็กเป็นแหล่งน้ำดิบสำหรับการผลิตน้ำประปาของจังหวัดเพชรบุรี และเมื่อนำตัวอย่างน้ำจากอ่างห้วยสองมาสกัดสารพิษและวิเคราะห์ด้วย HPLC พนบปริมาณสารพิษในปริมาณ 1.89 และ 5.63 ppb ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยองค์ประกอบสารพิษส่วนใหญ่เป็น Microcystin-RR ส่วนอ่างเก็บน้ำอีก 5 แห่งที่เหลือตรวจพบสารพิษเพียงเล็กน้อยด้วย ELISA kit และตรวจไม่พบด้วย HPLC

ในจำนวนปอหรือบึงน้ำขนาดเล็ก 4 แห่ง บึงบ้านสังคุมจังหวัดชลบุรีเป็นแหล่งน้ำสำหรับประปาหมู่บ้าน ซึ่งหันหมดตรวจพบสารพิษในปริมาณเล็กน้อยด้วย ELISA kit ในระดับ 0.09 – 0.49 ppb และมี 2 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ด้วย HPLC ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับวิธี ELISA (ตารางที่ 1)

มีข้อมูลที่นำเสนอจาก การทดลองข้างต้นของตัวอย่างจากเชื้อแบคทีเรีย และอ่างเก็บน้ำ หมายเลข 1 กฟก. ระบุว่า เมื่อทำการเก็บตัวอย่างไวนานประมาณ 4 เดือนที่อุณหภูมิห้อง พบร่วงปริมาณสารพิษในโครงสร้างที่ตรวจพบในระดับสูงตอนต้นมีปริมาณลดลงเหลือเพียง 0.08 และ 0.02 ppb ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วย ELISA kit และตรวจวิเคราะห์ไม่พบด้วย HPLC (ใช้ตัวอย่างน้ำเพียง 2 ลิตร) ซึ่งสาเหตุของการลดลงของสารพิษอาจจะมาจากการสลายตัวด้วยกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีผู้รายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายสารพิษในโครงสร้างได้ หรือสารพิษอาจถูกดูดซับด้วยตะกอนสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำ (Dow, et al., 1994) ซึ่งเป็นวิธีธรรมชาติที่อาจนำไปปรับใช้ได้ในการนี้ที่มีสารพิษปนเปื้อนในระดับต่ำ

กล่าวโดยสรุปชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ได้ผลิตขึ้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษในโครงสร้างในตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง และได้ผลเป็นที่น่าพอใจยิ่ง โดยประสิทธิภาพในการตรวจวัดมีความไวสูงกว่าวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ HPLC เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้โดยตรง (ไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษจากตัวอย่างปริมาณมากเหมือน HPLC) และสามารถใช้ได้เป็นอย่างดีสำหรับการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำต่างๆ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณยังจำต้องใช้ HPLC เป็นหลัก เนื่องจากชุดตรวจสอบที่ได้มาจาก polyclonal antibody

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษในน้ำธรรมชาติด้วยวิธี ELISA กับ HPLC

ลำดับ ที่	สถานที่	R^2 of Std.	Correlation Equation	Ave Abs. at 450 nm	Microcystin Conc. by ELISA (ppb)*	Microcystin Conc. by HPLC (ppb)**	Remarks
1.	แม่น้ำแม่กลอง (1)	0.9726	$y = -18.111x + 72.634$	0.906	4.81	3.24	อยุ 1 สีดาห์
	แม่น้ำแม่กลอง (2)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.126	0.08	ND	อยุ 4 เตือน RT
2.	แม่น้ำสังขะตะปง	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.260	0.09	ND	
3.	แม่น้ำอุบลรัตน์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.174	0.19	ND	
4.	แม่น้ำจุดภูรัง	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.058	0.56	ND	
5.	แม่น้ำศรีนคินทร์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.121	0.32	ND	
6.	แม่น้ำชีราลงกรณ์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.123	0.31	ND	
7.	แม่น้ำป่าสักชลสิทธิ์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	0.832	4.56	2.35	
8.	แม่น้ำมูล	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.022	0.791	0.57	
9.	แม่น้ำแม่วังอุดมรา瓦	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.029	0.736	0.24	
10.	อ่างเก็บน้ำ 1 กพภ. กรุงร.(1)	0.9726	$y = -18.111x + 72.634$	0.982	2.52	1.89	อยุ 1 สีดาห์
	อ่างเก็บน้ำ 1 กพภ. กรุงร.(2)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.236	0.02	ND	อยุ 4 เตือน RT
11.	อ่างเก็บน้ำบางพระ (1)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.155	0.05	ND	ซึ่งแสง
	อ่างเก็บน้ำบางพระ (2)	0.9976	$y = -17.356x + 70.777$	1.319	0.03	ND	หลังฝน

* n = 12

** ยังต้องตัวอย่างน้ำ 2-10 ลิตร

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซีสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติตัวอย่าง ELISA กับ HPLC (ต่อ)

ลำดับ ที่	สถานที่	R^2 of Std.	Correlation Equation	Ave Abs. at 450 nm	Microcystin Conc. by ELISA (ppb)*	Microcystin Conc. by HPLC (ppb)**	Remarks
12.	ถ่ายเก็บน้ำตามประชัย (1)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.111	0.01	ND	ช่วงแสง
	ถ่ายเก็บน้ำตามประชัย (2)	0.9976	$y = -17.356x + 70.777$	1.392	0.02	ND	หลังแสง
13.	ถ่ายเก็บน้ำต่อกราย (1)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.289	0.01	ND	ช่วงแสง
	ถ่ายเก็บน้ำต่อกราย (2)	0.9976	$y = -17.356x + 70.777$	1.364	0.02	ND	หลังแสง
14.	ถ่ายเก็บน้ำหนองปลาไหล (1)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.374	0.00	ND	ช่วงแสง
	ถ่ายเก็บน้ำหนองปลาไหล (2)	0.9976	$y = -17.356x + 70.777$	1.385	0.02	ND	หลังแสง
15.	ถ่ายเก็บน้ำแม่สิงโต	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.176	0.04	ND	หลังแสง
16.	ถ่ายเก็บน้ำห้วยขุนหล้า	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	0.832	4.41	5.63	
17.	ร่องห้วยหนองอี้ยะ	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.255	0.09	ND	
18.	ร่องบ้านต่อลง	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.132	0.29	0.24	
19.	บ่อปลา ม.บาง处境	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.072	0.49	0.38	
20.	บึงโสมสระกlongท่อออกากา	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.186	0.17	ND	

* n = 12

** สกัดจากตัวอย่าง 2 - 10 สิ่ง

2. อิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดของชุดตรวจสอบ ELISA kit

น้ำจากแหล่งธรรมชาติที่ใช้เพื่อการอุปโภคบริโภค หรือเป็นแหล่งน้ำดิบสำหรับการผลิตน้ำประปา มักจะมีคุณภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น ชนิดของดินและหินใกล้เคียง กิจกรรมการใช้ประโยชน์จากที่ดินของมนุษย์ (การเกษตร ที่พักอาศัย ฯลฯ) ปริมาณฝน เป็นต้น ทั้งหมดนี้จะพาน้ำเอกสารปนเปื้อนสูงเหล่าน้ำ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเกลือชนิดต่าง ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความชุ่มของสารแขวนลอยจากตะกอนดิน นอกจากนี้อีกไซด์ของโลหะบางชนิด เช่น สนิมเหล็ก อาจจะมาจากการท่อประปาที่เลื่อมสภาพ รวมทั้งสารคลอรินที่ใช้ในการผลิตน้ำประปาอาจตกค้างอยู่ในตัวอย่างน้ำ และส่งผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่ผลิตขึ้น

2.1 ผลของ pH

ในแหล่งน้ำธรรมชาติ pH ของน้ำจะผันแปรและขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดินและชนิดของหิน ในบริเวณใกล้เคียง เช่นแหล่งน้ำที่อยู่ในชุดดินรังสิต จะมี pH ต่ำ เนื่องจากดินมีฤทธิ์เป็นกรด ในขณะที่แหล่งน้ำที่อยู่ไกลแหล่งหินปูนจะมี pH ค่อนข้างสูง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ปรับ pH ของน้ำที่ใช้ในการวัดปริมาณสารพิษให้มีค่า 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ซึ่งจากการทดลองพบว่าช่วง pH ระหว่าง 4.0 – 8.0 ไม่พบว่ามีความผิดปกติในการวัดปริมาณสารพิษไม่ครอซติดตัวยชุดตรวจสอบ ELISA kit แต่อย่างใด โดยจะสังเกตได้จากค่า R^2 ของทุกระดับ pH ในช่วงนี้มีค่าสูงกว่า 0.9900 (ภาพที่ 4) โดยมีค่า % recovery ของสารพิษที่คำนวณจากสมการทดสอบพันธ์ที่ได้จากการตัวอย่างที่เตรียมจาก PBS pH 7.4 มากกว่า 70 % (ยกเว้นที่ pH 4.0) (ตารางที่ 2) ในขณะที่ pH ค่อนไปทางด่างที่ 8.5 และ 9.0 จะมีผลกระทบต่อการตรวจวัดปริมาณสารพิษ โดยจะให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.948 และ 0.854 ตามลำดับ ซึ่งจะต่ำกว่าปกติถึงน้อย (ภาพที่ 4) และเมื่อคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการทดสอบพันธ์ที่ได้จากการตัวอย่างที่เตรียมจาก PBS pH 7.4 จะได้ค่า % recovery ที่ผิดปกติเป็นอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความเข้มข้นของสารพิษ 5 ppb อย่างไรก็ตามถ้าทำการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการทดสอบพันธ์ของตนเองจะได้ค่าที่ใกล้เคียงกับปริมาณสารพิษที่ใส่ลงไป (ตารางที่ 3) ซึ่งอาจสรุปได้ว่าชุดตรวจสอบนี้สามารถใช้ตรวจสารพิษในตัวอย่างน้ำที่มักจะมี pH อยู่ในช่วง 5.5 – 7.5 โดยไม่มีปัญหาในการใช้งาน

ตารางที่ 2 อิทธิพลของ pH ต่อประสิทธิภาพการวัดระดับปริมาณสารพิษไม่ทราบตัวยุบตัวเร่ง ELISA kit เมื่อคำนวณจากการที่ตีจาก PBS

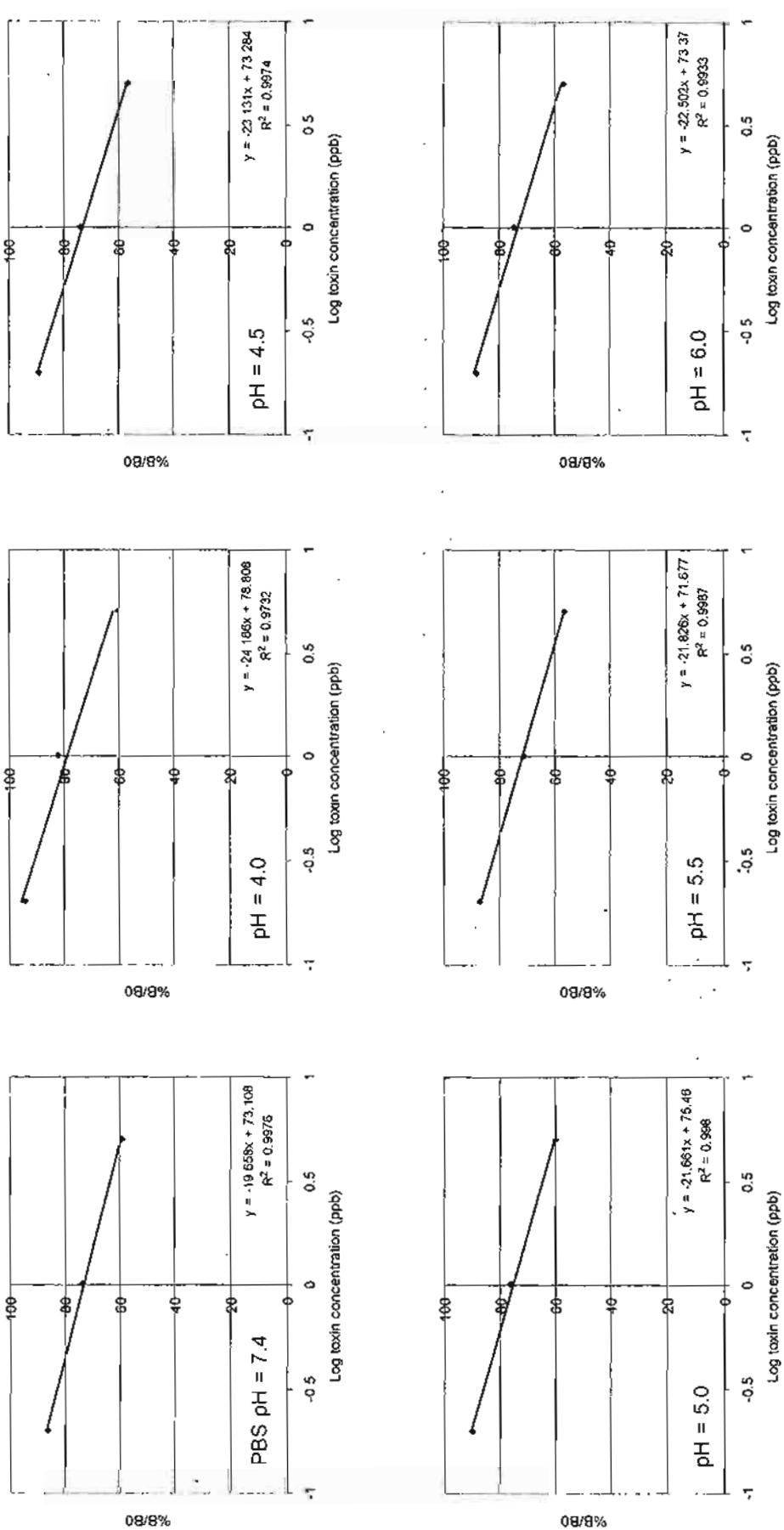
n = 12

PH	Microcystin concentration (ppb)																		
	0			0.2			1			5									
	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD							
PBS*	3.339	0.076	NA	NA	2.887	0.107	86.46	0.209	104.7	2.467	0.125	73.89	0.912	91.2	1.969	0.210	58.98	5.234	104.7
4.0	3.104	0.277	NA	NA	2.921	0.107	94.08	0.086	42.9	2.547	0.090	82.04	0.351	35.1	1.872	0.113	60.30	4.483	89.7
4.5	3.037	0.182	NA	NA	2.702	0.149	88.98	0.156	77.9	2.255	0.149	74.23	0.877	87.7	1.720	0.144	56.64	6.881	137.6
5.0	2.812	0.064	NA	NA	2.537	0.107	90.21	0.135	67.5	2.144	0.072	76.24	0.693	69.3	1.686	0.040	59.93	4.682	93.6
5.5	3.053	0.166	NA	NA	2.664	0.172	87.25	0.191	95.4	2.169	0.080	71.04	1.274	127.4	1.732	0.067	56.74	6.801	136.0
6.0	2.799	0.119	NA	NA	2.473	0.055	88.35	0.168	83.9	2.096	0.045	74.86	0.814	81.4	1.593	0.043	56.89	6.680	133.6
6.5	3.137	0.107	NA	NA	2.732	0.101	87.09	0.194	97.2	2.308	0.091	73.58	0.947	94.7	1.806	0.040	57.57	6.169	123.4
7.0	3.015	0.069	NA	NA	2.563	0.035	85.01	0.248	124.1	2.096	0.085	69.51	1.524	152.4	1.616	0.067	53.60	9.831	196.6
7.5	2.906	0.133	NA	NA	2.497	0.079	85.93	0.223	111.4	2.106	0.068	72.47	1.077	107.7	1.654	0.066	56.92	6.661	133.2
8.0	2.892	0.095	NA	NA	2.598	0.056	89.83	0.141	70.6	2.104	0.033	72.74	1.044	104.4	1.553	0.052	53.71	9.705	194.1
8.5	2.660	0.079	NA	NA	1.951	0.152	73.36	0.971	485.7	1.794	0.095	67.44	1.943	194.3	1.422	0.101	53.44	10.010	200.2
9.0	2.651	0.078	NA	NA	1.982	0.079	74.74	0.826	413.0	1.814	0.053	68.43	1.729	172.9	0.804	0.044	30.31	150.4	3009

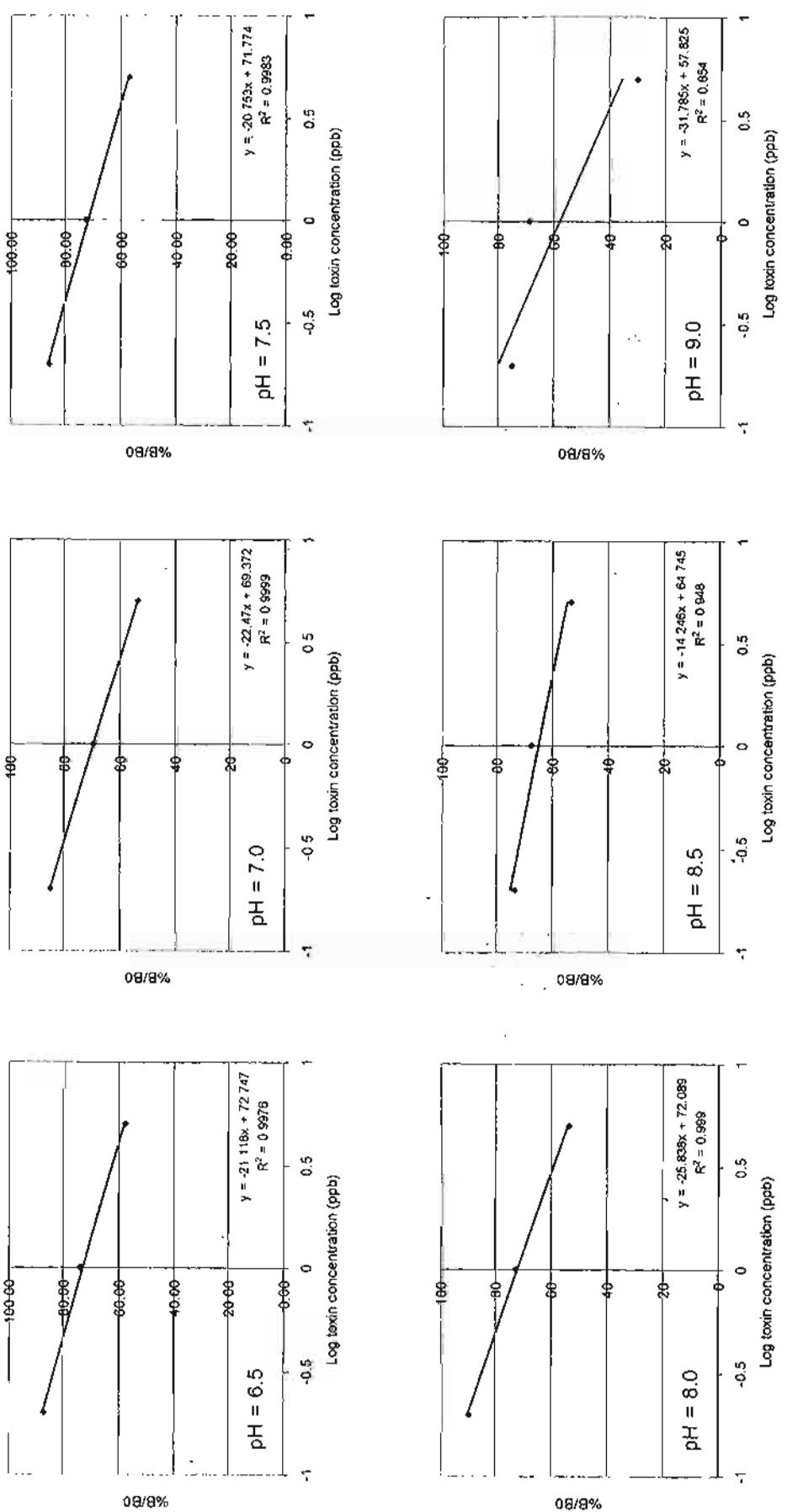
* Phosphate buffer solution pH 7.4; R² = 0.9976; y = -19.658x + 73.108

ตารางที่ 3 อิทธิพลของ pH ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไม่ทราบต้นตัวยานุตราชะจะด้วย ELISA kit เมื่อกำหนดเวลาในการทดสอบ

pH	Microcystin concentration (ppb)																				
	0	0.2	1	5	Ave Abs. 450 nm	% Recovery	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% Recovery	Conc. by ELISA	% Recovery	Conc. by ELISA	% Recovery	% Recovery	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% Recovery	% B/B ₀	SD	Average
4.0	3.104	0.277	NA	NA	2.921	0.107	94.08	0.233	116.7	2.547	0.090	82.04	0.735	73.5	1.872	0.113	60.30	5.833	116.7	0.277	0.277
4.5	3.037	0.182	NA	NA	2.702	0.149	88.98	0.210	104.8	2.255	0.149	74.23	0.910	91.0	1.720	0.144	56.64	6.242	104.8	0.182	0.182
5.0	2.812	0.064	NA	NA	2.537	0.107	90.21	0.208	104.2	2.144	0.072	76.24	0.208	104.2	1.685	0.040	59.93	5.212	104.2	0.064	0.064
5.5	3.053	0.166	NA	NA	2.664	0.172	87.3	0.193	96.7	2.062	0.121	67.5	1.070	107.0	1.566	0.121	51.3	4.834	96.7	0.166	0.166
6.0	2.799	0.119	NA	NA	2.523	0.061	90.14	0.216	107.9	2.140	0.105	76.45	0.858	85.8	1.279	0.071	45.71	5.397	107.9	0.119	0.119
6.5	3.137	0.107	NA	NA	2.585	0.167	82.39	0.209	104.6	2.308	0.091	73.58	0.914	91.4	1.453	0.089	46.31	5.231	104.6	0.107	0.107
7.0	3.015	0.069	NA	NA	2.563	0.035	85.01	0.201	100.7	2.096	0.085	69.51	0.986	98.6	1.616	0.067	53.60	5.036	100.7	0.069	0.069
7.5	2.906	0.133	NA	NA	2.431	0.098	83.64	0.208	104.0	2.156	0.133	74.19	0.925	92.5	1.604	0.066	55.20	5.198	104.0	0.133	0.133
8.0	2.892	0.095	NA	NA	2.598	0.056	89.83	0.219	109.7	2.104	0.033	72.74	1.006	100.6	1.553	0.052	53.71	5.487	109.7	0.095	0.095
8.5	2.660	0.079	NA	NA	1.951	0.152	73.36	0.249	124.3	1.794	0.095	67.44	0.647	64.7	1.422	0.101	53.44	6.215	124.3	0.079	0.079
9.0	2.651	0.078	NA	NA	1.982	0.079	74.74	0.294	146.8	1.814	0.053	68.43	0.464	46.4	0.804	0.044	30.31	7.342	146.8	0.078	0.078



ภาพที่ 4 แสดงผลลัพธ์การ Graf ค่าสัมประสิทธิ์เบลล์เมgarachnan การทดสอบพัฒนา ของผลการวัดด้วยชุดตรวจทาง ELISA kit ในการตรวจวัดตัวอย่างน้ำทึบ pH 4.0 – 9.0



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะการรักษาค่าตัวอย่างเพื่อประเมินการทดสอบพัฒนา ของผลการวิเคราะห์สารพิษไม่ครึ่งสัดหนึ่งจากการตรวจด้วยชุดตรวจ ELISA kit ในการตรวจวัดตัวอย่างเพื่อ pH 4.0 – 9.0 (ต่อ)

2.2 ผลกระทบของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

NaCl เป็นเกลือที่พบบ่นเป็นอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณแฉะชายทะเล และแหล่งน้ำที่ใกล้ติดเค็มในหลายจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในการทดลองนี้ได้ปรับปริมาณของ NaCl (MW 58.44) ในน้ำ ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 mM จากการทดลองพบว่าปริมาณเกลือในระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mM ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจสารพิษในโครซิสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9995, 0.9996 และ 0.9973 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) และในการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery มากรกว่า 70% (ตารางที่ 4) แต่เมื่อความเข้มข้นของ NaCl ในตัวอย่างน้ำสูงถึง 150 และ 200 mM ผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษเริ่มมีค่าปกติถึงแม้ว่าค่า R^2 จะยังคงสูงกว่า 0.96 โดยที่ในตัวอย่างที่มีปริมาณสารพิษ 0.2 ppb ค่า % recovery จากการวัดด้วย ELISA kit ให้ผลผิดปกติ แต่เมื่อบริมาณสารพิษอยู่ในระดับสูง 1 และ 5 ppb การตรวจวัดสารพิษให้ค่า % recovery ปกติ อย่างไรก็ตามอิทธิพลของเกลือ NaCl ที่ระดับ 150 และ 200 mM ไม่น่าจะมีผลต่อการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจสารพิษในโครซิสติน เนื่องจากไม่เคยมีรายงานว่าพนิชยาในแบบที่เรียก Microcystis ที่ผลิตสารพิษนี้ในแหล่งน้ำที่มีเกลืออยู่ ดังนั้นในตัวอย่างน้ำที่มีความเค็มระดับ 150 – 200 mM จะเท่ากับความเค็มประมาณ 10 ppt คาดว่าคงไม่มีสาหร่ายพิษชนิดนี้เจริญได้ และทำการคำนวณปริมาณสารพิษจากการสหสัมพันธ์ของตนเองจะได้ค่า % recovery ที่สูงขึ้นและมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณสารพิษที่ส่องไป (ตารางที่ 5) กล่าวโดยสรุปก็คือ ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจสารพิษในโครซิสติน อย่างมีประสิทธิภาพในแหล่งน้ำจืดทั่วไปที่มีระดับความเค็มจากเกลือ NaCl ไม่เกิน 10 ppt

ตารางที่ 4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยชุดตรวจของ ELISA kit เมื่อคำนวณจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จากการ PBS

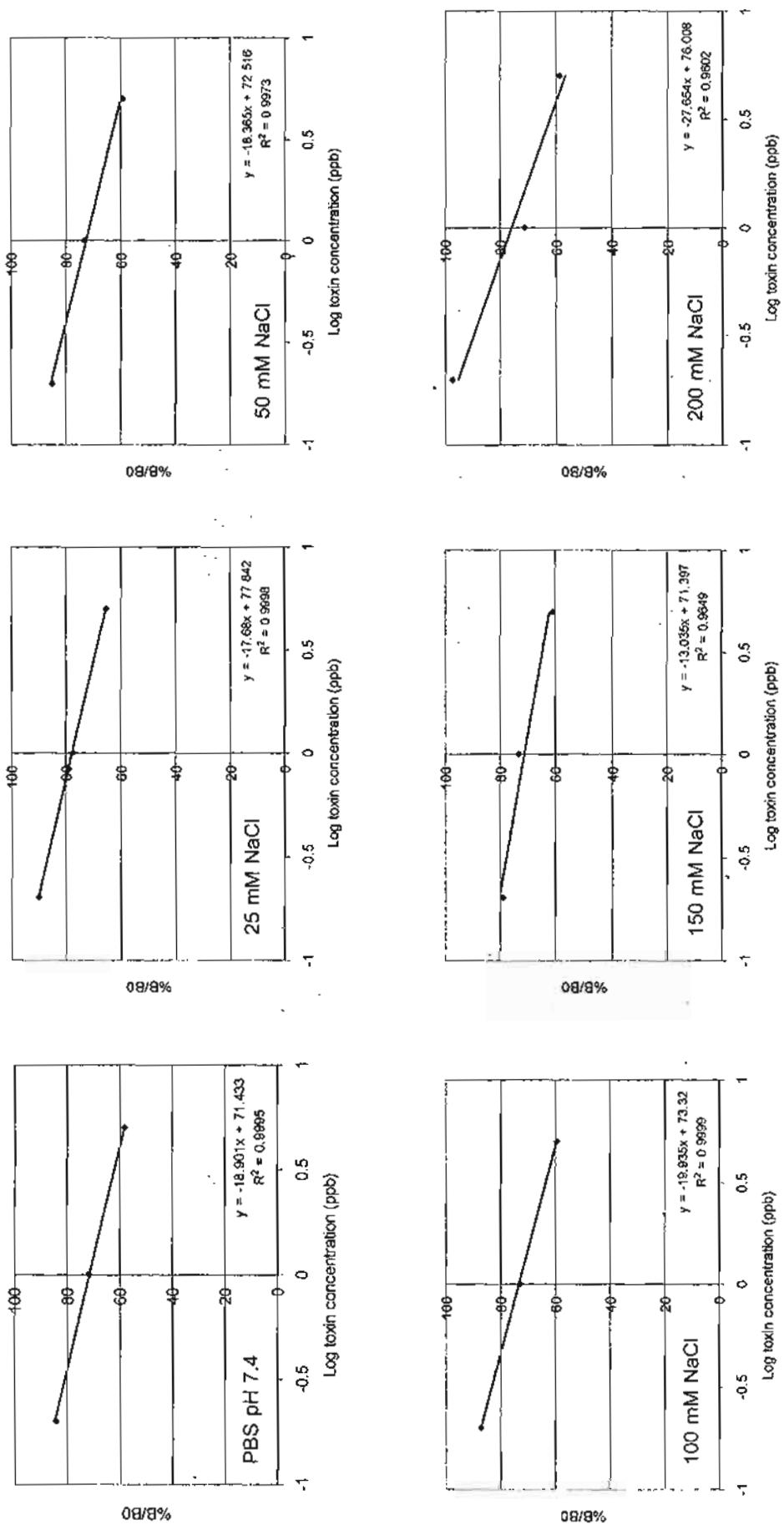
Microcystin concentration (ppb)										n = 12
0		0.2		1		5				% Recovery
NACI Concentration (mM)		Ave Abs. 450 nm,	SD	Ave Abs. 450 nm,	SD	Ave Abs. 450 nm,	SD	Ave Abs. 450 nm,	SD	Conc. by ELISA
PBS*	0.048	NA	NA	0.021	84.07	0.234	116.9	1.128	0.030	75.09
25	0.050	NA	NA	0.041	90.10	0.228	113.8	0.904	0.027	77.44
50	0.053	NA	NA	0.044	84.97	0.208	104.2	0.939	0.027	73.29
100	0.048	NA	NA	0.031	87.34	0.154	77.1	0.990	0.038	73.15
150	0.047	NA	NA	0.040	79.50	0.418	208.8	0.927	0.040	73.40
200	0.064	NA	NA	0.052	97.61	0.042	20.9	0.951	0.035	71.46

* Phosphate buffer solution pH 7.4; $R^2 = 0.9726$; $y = -18.111x + 72.634$

ตารางที่ 5 อัตราการรีฟลักชันของ NaCl ต่อประสิทธิภาพการวัดสารพิษไมโครไซส์ติดตัวยูดูตราเจสอย ELISA kit เมื่อคำนวณจากการทดสอบพัฒนา

ของตัวอย่าง

Microcystin concentration (ppb)										n = 12									
		0		0.2		1		5											
		Ave Abs. 450 nm	% B/B0	% Recovery															
		Conc. by ELISA	SD	% Recovery															
		Ave Abs. 450 nm	% Recovery	% Recovery															
25	1.167	0.050	NA	NA	1.051	0.041	90.10	0.197	98.7	0.904	0.027	77.44	0.197	98.7	0.763	0.043	65.39	4.934	98.7
50	1.281	0.053	NA	NA	1.048	0.035	81.77	0.210	105.0	0.969	0.035	75.63	0.908	90.8	0.760	0.030	59.29	5.248	105.0
100	1.353	0.048	NA	NA	1.182	0.031	87.34	0.198	99.0	0.990	0.038	73.15	1.020	102.0	0.805	0.031	59.47	4.950	99.0
150	1.262	0.047	NA	NA	1.004	0.040	79.50	0.245	122.5	0.927	0.040	73.40	0.704	70.4	0.774	0.028	61.28	5.740	114.8
200	1.331	0.064	NA	NA	1.299	0.052	97.61	0.166	82.8	0.951	0.035	71.46	1.460	146.0	0.784	0.025	58.95	4.138	82.8



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะของการฟอกค่าสัมประสิทธิ์และสมการพารabolic ของผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษในโตรซิสตินในตัวอย่างสำหรับห้องน้ำที่บ้านรับประทานคลาวด์บูตเตอร์ NaCl 25, 50, 100, 150 และ 200 mM ด้วยชุดตรวจจสอบ ELISA kit

2.3 ผลของเกลือแมกนีเซียม

เกลือแมกนีเซียมที่พบในน้ำส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ $MgSO_4$ ซึ่งเป็นเกลืออิอกซินิดหนึ่งที่พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณแม่น้ำและแม่น้ำที่ใกล้ดินเค็มในหลายจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในการทดลองนี้ได้ปรับปริมาณของ $MgSO_4$ (MW 102.4) ในน้ำให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 mM จากการทดลองพบว่าปริมาณเกลือ $MgSO_4$ ในทุกระดับความเข้มข้น มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจสารพิษไมโครซิสติน โดยจะให้ค่า % recovery จากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ในระดับต่ำกว่าปกติ (เฉลี่ยประมาณ 50%) (ตารางที่ 6) ทั้งๆที่ค่า R^2 จะมีค่าค่อนข้างสูงอยู่ที่ 0.9968, 0.9845, 0.9632, 0.9698 และ 0.9154 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) แต่เมื่อคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเองได้ค่า % recovery ในระดับที่น่าพอใจ (ตารางที่ 7) ดังนั้นอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า เกลือ $MgSO_4$ มีผลกระทบต่อการตรวจสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำ โดยมีแนวโน้มว่าผลการตรวจจะได้ค่าต่ำกว่าที่ควรเป็นประมาณครึ่งหนึ่ง แต่ยังคงสามารถใช้ตรวจสารพิษเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนได้

ตารางที่ 6 อิทธิพลของเกลือ MgSO₄ ต่อประสิทธิภาพการวัดระดับปริมาณสารพิษไมโครไซส์ตัวยูดตรวจโดย ELISA kit เมื่อทำน้ำแข็งและการทดสอบที่ได้จาก PBS

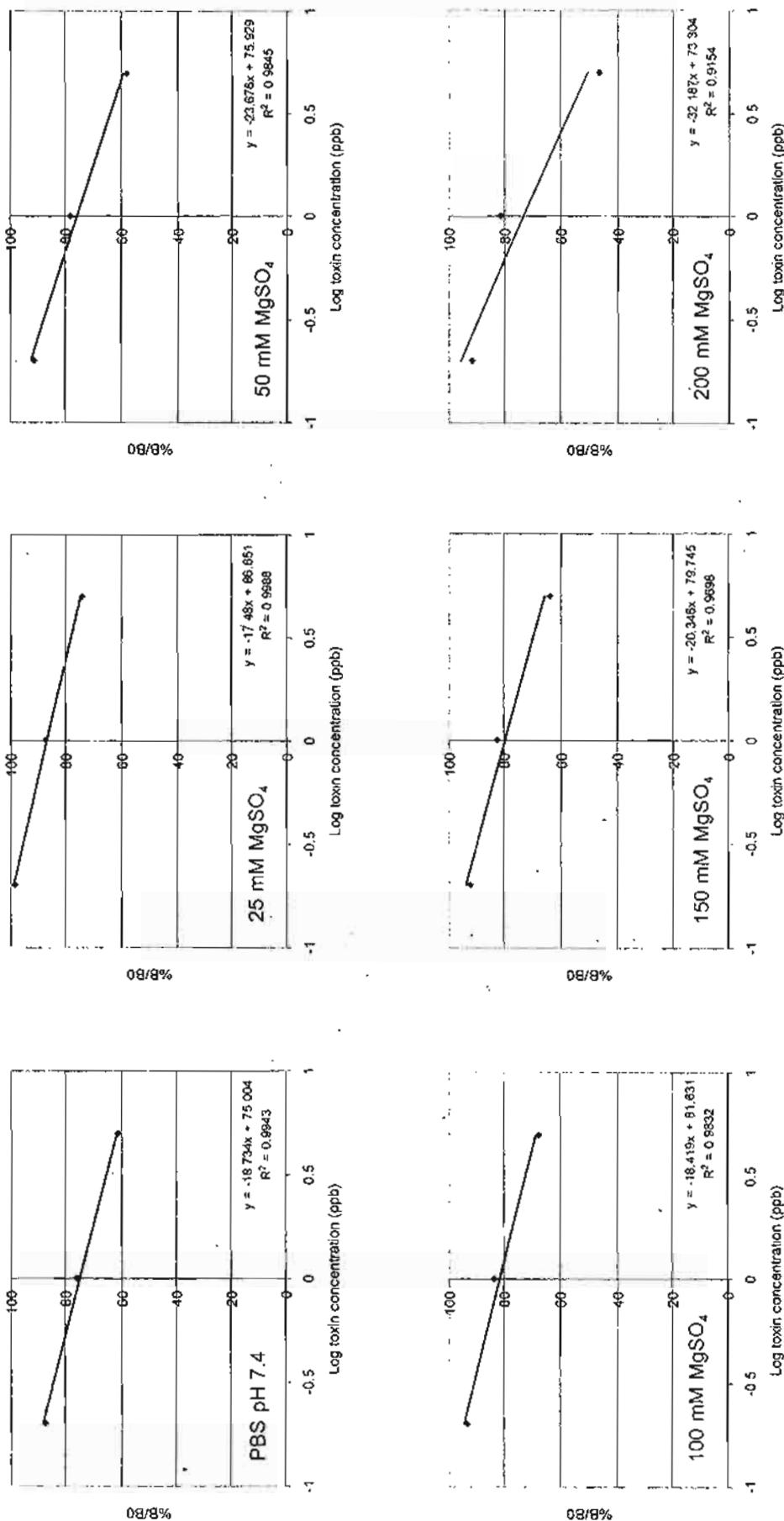
Microcystin concentration (ppb)										n = 12									
		0		0.2		1		5											
										% Recovery									
		Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Average									
		SD	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	SD	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	SD									
PBS*	0.971	0.035	NA	NA	0.850	0.044	87.52	0.215	107.3	0.740	0.043	76.15	0.868	86.8	0.596	0.015	61.34	5.366	107.3
25	1.732	0.049	NA	NA	1.579	0.053	91.18	0.166	83.1	1.173	0.028	67.74	0.635	63.5	0.638	0.015	36.86	3.710	74.2
50	1.949	0.053	NA	NA	1.779	0.054	91.28	0.135	67.6	1.527	0.045	78.33	0.665	66.5	1.134	0.056	58.18	7.906	158.1
100	1.837	0.033	NA	NA	1.718	0.028	93.53	0.101	60.5	1.535	0.044	83.58	0.265	26.5	1.245	0.060	67.78	1.224	24.5
150	1.260	0.079	NA	NA	1.166	0.032	92.52	0.111	55.7	1.041	0.026	82.64	0.290	29.0	0.807	0.017	64.07	1.753	35.1
200	1.402	0.051	NA	NA	1.288	0.026	91.85	0.119	59.4	1.138	0.063	81.20	0.334	33.4	0.657	0.254	46.86	9.298	186.0

* Phosphate buffer solution pH 7.4; R² = 0.9726; y = -23.764x + 69.87

ตารางที่ 7 อัตราผิดของเกลือ MgSO₄ ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซีสต์ตัวยูดูราเจสูป ELISA kit เมื่อกำนวนจากสมการทดสอบส้มพันธุ์

ข้อมูลเม็ด

Microcystin concentration (ppb)											n = 12									
0			0.2			1			5			% Recovery								
												Ave Abs. 450 nm	Conc. by ELISA	SD	% B/B ₀					
												% Recovery	Conc. by ELISA	SD	% B/B ₀					
												Ave Abs. 450 nm	Conc. by ELISA	SD	% Recovery					
MgSO ₄ Concentration (mM)																				
25	1.732	0.049	NA	NA	NA	1.579	0.053	91.18	0.215	107.6	1.173	0.028	67.74	0.863	86.3	0.638	0.015	36.86	5.381	107.6
50	1.949	0.053	NA	NA	NA	1.779	0.054	91.28	0.225	112.4	1.527	0.045	78.33	0.792	79.2	1.134	0.056	58.18	5.618	112.4
100	1.837	0.033	NA	NA	NA	1.718	0.028	93.53	0.226	112.9	1.535	0.044	83.58	0.784	78.4	1.245	0.060	67.78	5.646	112.9
150	1.260	0.079	NA	NA	NA	1.166	0.032	92.52	0.236	117.8	1.041	0.026	82.64	0.720	72.0	0.807	0.017	64.07	5.891	117.8
200	1.402	0.051	NA	NA	NA	1.288	0.026	91.85	0.265	132.6	1.138	0.063	81.20	0.568	56.8	0.657	0.254	46.86	6.632	132.6



ภาพที่ 6 เส้นทางถั่งเช่าและการฟื้นคืนชีพรากเมล็ดสิ่งมหันต์ ของผงผลการทดสอบพิษแม่โคร์เรซตินในตัวถั่งเช่าที่ปรับระดับด้วยสารเพิ่มเติม ด้วยวิธีการ bioassay ELISA kit MgSO₄ 25, 50, 100, 150 และ 200 mM ด้วยชุดตรวจสูตร ELISA kit

2.4 ผลของเกลือแคลเซียม

เกลือแคลเซียมในแหล่งน้ำมักจะอยู่ในรูป CaCO_3 หรือ $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ พบระลายน้ำในแหล่งน้ำที่ใกล้เข้ากันปูน ในการทดลองนี้ได้ปรับปริมาณของ CaCO_3 (MW 100.1) ในน้ำให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 300 mM จากการทดลองพบว่าปริมาณเกลือในระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mM ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจสารพิษไมโครซิสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9845, 0.9874 และ 0.9173 ตามลำดับ (ภาพที่ 7) และในการคำนวนปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery ประมาณ 70% หรือสูงกว่า (ตารางที่ 8) แต่เมื่อความเข้มข้นของ CaCO_3 ในตัวอย่างน้ำสูงถึง 150, 200 และ 300 mM ผลการตรวจปริมาณสารพิษเริ่มมีค่าผิดปกติถึงแม้ว่าค่า R^2 จะยังคงสูงกว่า 0.95 โดยที่ในตัวอย่างที่มีปริมาณสารพิษ 0.2 ppb ค่า % recovery จากการวัดด้วย ELISA kit ให้ผลตามปกติ แต่เมื่อปริมาณสารพิษอยู่ในระดับสูง 1 ค่า % recovery จะอยู่ที่ระดับประมาณ 50% และที่ระดับ 5 ppb ค่า % recovery จะอยู่ที่ระดับประมาณเพียง 25% อย่างไรก็ตามถ้าคำนวนปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเอง ค่า % recovery จะยังคงอยู่ในระดับสูงที่น่าพอใจ (ตารางที่ 9) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจสารพิษไมโครซิสตินอย่างมีประสิทธิภาพในแหล่งน้ำจืดทั่วไปที่มีระดับความเค็มจากเกลือแคลเซียมไม่เกิน 100 mM และในการนี้ที่พบว่ามีการรบกวนของเกลือแคลเซียม อาจจะสามารถลดปัญหาการรบกวนนี้ได้โดยการเติม calibrator ในสารละลายน้ำที่มีเกลือแคลเซียมในระดับที่ใกล้เคียงกับตัวอย่าง

ตารางที่ 8 อิทธิพลของเกลือ CaCO₃ ต่อประสิทธิภาพการวัดราดีเมโนซินในเครื่องตรวจสารพิษในน้ำโดย ELISA kit เมื่อคำนวณจากสมการการสหสัมพันธ์ที่ได้จากการ PBS

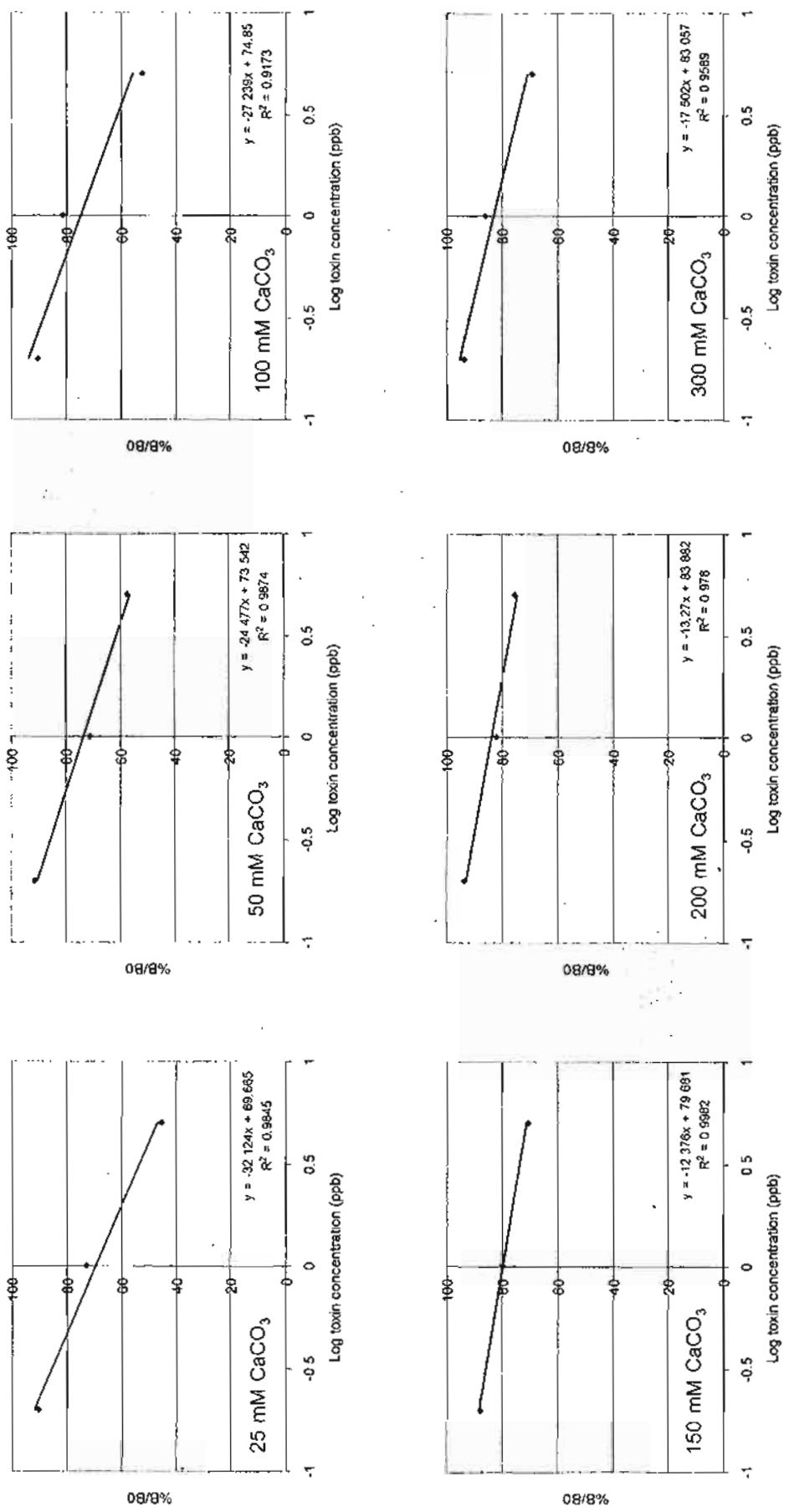
Microcystin concentration (ppb)										n = 12										
0			0.2			1			5											
CaCO ₃ Concentration (mM)	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	% Recovery				
PBS*	1.247	0.031	NA	NA	NA	1.204	0.038	96.61	0.207	103.7	0.942	0.039	75.58	0.938	93.8	0.642	0.012	51.46	5.380	107.6
25	1.335	0.028	NA	NA	NA	1.208	0.039	90.49	0.321	160.5	0.974	0.053	72.92	1.137	113.7	0.609	0.032	45.58	8.238	164.8
50	1.361	0.042	NA	NA	NA	1.249	0.049	91.77	0.293	146.5	0.971	0.034	71.31	1.277	127.7	0.783	0.027	57.55	3.462	69.2
100	1.032	0.058	NA	NA	NA	0.935	0.038	90.59	0.319	159.3	0.840	0.038	81.45	0.613	61.3	0.542	0.026	52.51	4.987	99.7
150	0.817	0.041	NA	NA	NA	0.720	0.048	88.12	0.380	190.0	0.655	0.035	80.11	0.675	67.5	0.579	0.038	70.82	1.324	26.5
200	0.836	0.045	NA	NA	NA	0.786	0.032	93.96	0.251	125.3	0.688	0.035	82.27	0.577	57.7	0.631	0.049	75.41	0.949	19.0
300	0.765	0.053	NA	NA	NA	0.718	0.061	93.83	0.253	126.5	0.658	0.056	85.98	0.441	44.1	0.530	0.046	69.36	1.471	29.4

* Phosphate buffer solution pH 7.4; R² = 0.9984; y = -32.292x + 74.55

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบของ CaCO₃ ต่อประสิทธิภาพการวัดระดับปริมาณสารพิษไม่คงที่ในน้ำโดยใช้ ELISA kit เมื่อคำนวณจากสมการการ校正แล้วพันธุ์

ข้อมูลเม็ด

Microcystin concentration (ppb)										n = 12							
0		0.2		1		5											
CaCO ₃ Concentration (mM)	Ave Abs. 450 nm	Conc. by ELISA		Conc. by ELISA		Conc. by ELISA		Conc. by ELISA		% Recovery							
		Ave Abs. 450 nm	SD	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	Conc. by ELISA	% Recovery	% Recovery							
25	1.335	0.028	NA	NA	90.49	0.225	112.4	0.974	0.053	72.92	79.2	0.609	0.032	45.58	5.619	5.619	112.4
50	1.361	0.042	NA	NA	91.77	0.180	90.0	0.971	0.034	71.31	123.3	0.783	0.027	57.55	4.502	90.0	
100	1.032	0.058	NA	NA	90.59	0.264	132.2	0.840	0.038	81.45	0.572	57.2	0.542	0.026	52.51	6.609	132.2
150	0.817	0.041	NA	NA	88.12	0.208	104.0	0.655	0.035	80.11	0.924	92.4	0.579	0.038	70.82	5.201	104.0
200	0.836	0.045	NA	NA	93.96	0.174	87.0	0.688	0.035	82.27	132.2	0.631	0.049	75.41	4.350	87.0	
300	0.765	0.053	NA	NA	93.83	0.242	121.2	0.658	0.056	85.98	0.681	68.1	0.530	0.046	69.36	6.061	121.2



ภาพที่ 7 แสดงถึงรากของรากค่ากึ่งชีวภาพ ค่ากึ่งชีวภาพสิ่งมีชีวิตและสมการพารามิเตอร์ที่ได้จากการวัดค่าปริมาณที่ปรับระดับตามเข้มข้นของ CaCO_3 25, 50, 100, 150, 200 และ 300 mM ตัวชี้ชุดตรวจของ ELISA kit

2.5 ผลของเหล็ก

เหล็กที่ป่นเป็นไน้มักจะอยู่ในรูปของเหล็กออกไซด์ (Fe_2O_3) โดยถ้าเป็นเหล็กน้ำธรรมชาติมักจะมาจากดินบริเวณใกล้เคียง ได้แก่ ดินลูกรัง หรือดินที่มีสีแดงส้ม (เช่น ชุดดินโคราช) แต่ถ้าเป็นระบบน้ำประปาจะมาจากการห่อเหล็กที่ใช้ในการส่งน้ำมีสภาพเก่า และมีสนิมเหล็กละลายออกมาก ในการทดลองนี้ได้ใช้เหล็กทั้งที่อยู่ในรูปริวิคิวซ์ ($FeSO_4$) และที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ [$Fe_2(SO_4)_3$] ซึ่งในกรณีของ $FeSO_4$ ถึงแม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยแค่ 2.5 mM ก็รับการตรวจวิเคราะห์ของชุดตรวจสอบ ELISA จนไม่สามารถตรวจผลได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่ในกรณีของ $Fe_2(SO_4)_3$ (MW 399.9) ทำการปรับให้มีระดับความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 30 mM จากการทดลองพบว่าปริมาณ $Fe_2(SO_4)_3$ ในระดับความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mM ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษในโครชีสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9984, 0.9999 และ 0.9979 ตามลำดับ (ภาพที่ 8) และในการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสาหัสพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery มากกว่า 75% (ตารางที่ 10) แต่เมื่อความเข้มข้นของ $Fe_2(SO_4)_3$ ในตัวอย่างน้ำสูงถึง 20 และ 30 mM ผลการตรวจน้ำดีบปริมาณสารพิษแสดงค่าผิดปกติอย่างชัดเจน โดยที่ค่า R^2 จะค่อนข้างต่ำที่ 0.8424 และ 0.7182 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น slope -v' เส้นกราฟที่มี $Fe_2(SO_4)_3$ 20 mM บังกลับทิศทาง และค่า %B/B₀ มีค่าสูงมากจนบางตัวอย่างมากกว่า 100 (ซึ่งเป็นไปไม่ได้) อย่างไรก็ตามถ้าคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสาหัสพันธ์ของตนเอง ค่า % recovery จะยังคงอยู่ในระดับสูงที่น่าพอใจ (ตารางที่ 11) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจวัดสารพิษในโครชีสตินอย่างมีประสิทธิภาพในแหล่งน้ำจืดทั่วไปที่มีระดับของเหล็กในรูปออกซิไดซ์ไม่เกิน 10 mM และถ้าเป็นเหล็กในรูปริวิคิวส์การรับกวนจะรุนแรงมากจนไม่สามารถใช้ชุด ELISA kit นี้ได้

ตารางที่ 10 อิทธิพลของเกลือ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ต่อประสิทธิภาพการวัดสารพิษในน้ำโดยตรวจตอน ELISA kit เมื่อคำนวณจากสมการ
สหสัมพันธ์ได้จาก PBS

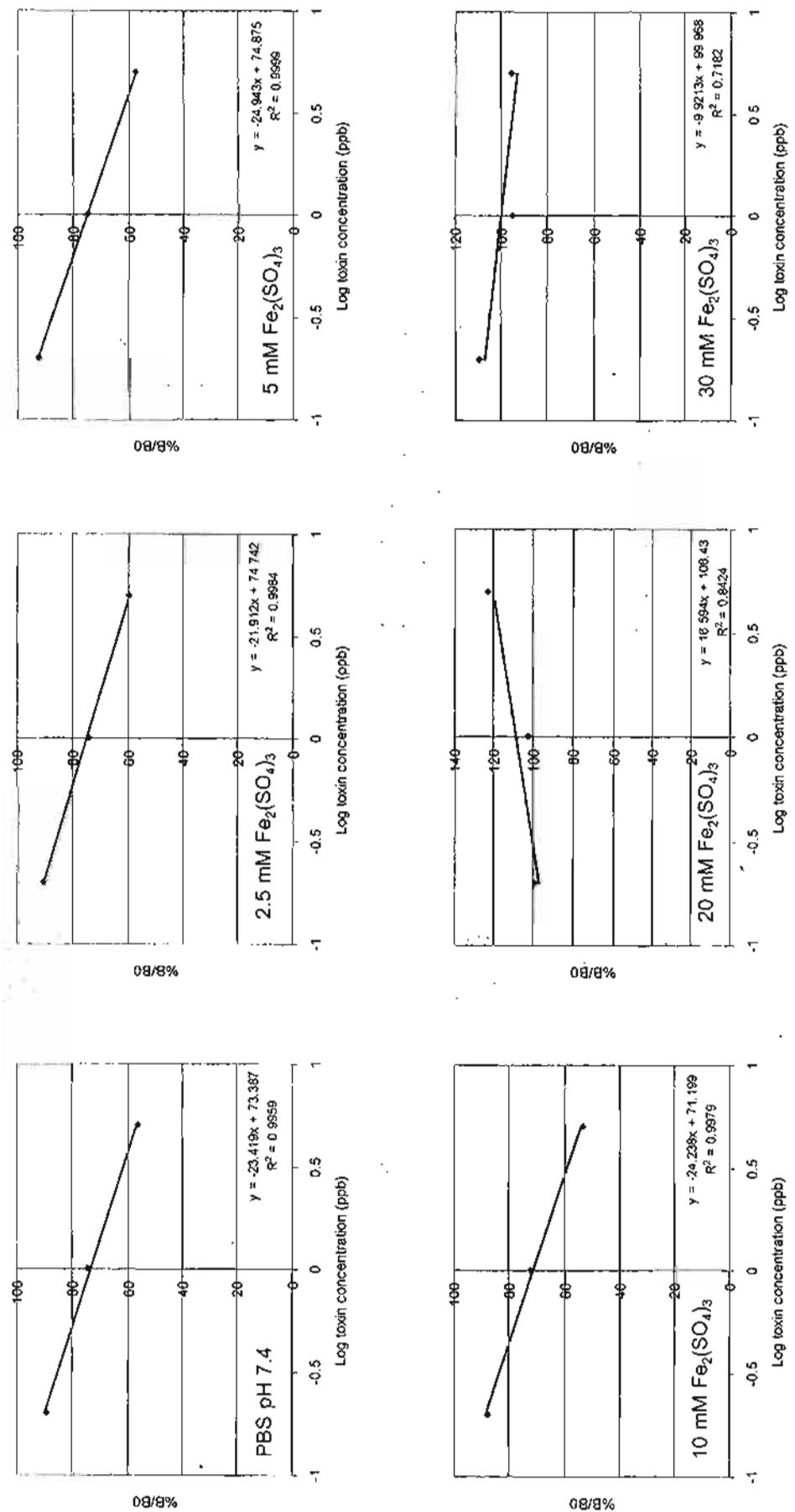
Microcystin concentration (ppb)										n = 12									
0			0.2			1			5										
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ Concentration (mM)	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Average	SD	% Recovery	Conc. by ELISA							
PBS*	1.107	NA	NA	0.969	0.028	87.50	0.250	124.8	0.851	0.013	76.87	0.710	71.0	0.624	0.020	56.37	5.327	106.5	
2.5	1.601	0.118	NA	NA	1.448	0.107	90.41	0.187	93.7	1.185	0.092	74.03	0.939	93.9	0.957	0.088	59.78	3.810	76.2
5	1.690	0.103	NA	NA	1.562	0.118	92.43	0.154	76.9	1.261	0.080	74.64	0.884	88.4	0.973	0.080	57.56	4.742	94.8
10	1.455	0.344	NA	NA	1.275	0.199	87.69	0.245	122.6	1.049	0.231	72.10	1.134	113.4	0.783	0.095	53.80	6.858	137.2
20	1.484	0.130	NA	NA	1.480	0.246	99.73	0.075	37.5	1.523	0.257	102.6	0.056	5.6	1.824	0.296	122.9	0.008	0.2
30	1.471	0.134	NA	NA	1.609	0.128	109.4	0.029	14.5	1.397	0.172	94.96	0.120	12.0	1.405	0.372	95.54	0.113	2.3

* Phosphate buffer solution pH 7.4; $R^2 = 0.9726$; $y = -23.419x + 73.378$

ตารางที่ 11 อิอกซิฟลูอองเกลส์กอ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ต่อบัวสีพิทักษิการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไม่ไดร์ซึสตินด้วยชุดตรวจของ ELISA kit เมื่อทำการวิเคราะห์ในสัมภาระน้ำของต้นบ่อ

Microcystin concentration (ppb)										n = 12									
0			0.2			1			5										
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ Concentration (mM)	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	Average	SD	% Recovery							
2.5	1.601	0.118	NA	NA	1.448	0.107	90.41	0.193	96.3	1.185	0.092	74.03	0.193	96.3	0.957	0.088	59.78	4.947	98.9
5	1.690	0.103	NA	NA	1.562	0.118	92.43	0.198	98.9	1.261	0.080	74.64	1.022	102.2	0.973	0.080	67.56	4.742	94.8
10	1.455	0.344	NA	NA	1.275	0.199	87.69	0.209	104.4	1.049	0.231	72.10	0.918	91.8	0.783	0.095	53.80	5.220	104.4
20*	1.484	0.130	NA	NA	1.480	0.245	99.73	0.299	149.5	1.523	0.257	102.6	0.448	44.8	1.824	0.296	122.9	7.475	149.5
30*	1.471	0.134	NA	NA	1.609	0.128	109.4	0.112	55.9	1.397	0.172	94.95	3.203	320.3	1.405	0.372	95.54	2.794	55.9

*หมายเหตุ ลักษณะของสัมภาระสัมผัสร่วมกันที่ทางจราจร negative slope เมื่อ $R^2 < 0.7$ คือข้างดำ และค่า %B/B₀ สูงมากผิดปกติ



ภาพที่ 8 แสดงถึงสัดส่วนของรากฟัน ค่าสัมประสิทธิ์และสมการพารabolic ของผลการทดสอบพิษในครรภ์สติโนนั้นตัวอย่างนี้ทำให้ปรับระดับความเข้มข้นของ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2.5, 5, 10, 20 และ 30 mM ด้วยชุดตรวจโดย ELISA kit

2.6 ผลของคลอริน

คลอรินเป็นสารที่เดิมลงไปในน้ำประปาเพื่อทำลายจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่ก่อโรค ในระบบการผลิตน้ำประปาจะใช้ก๊าซคลอรีนใส่ลงไปในน้ำโดยตรง แต่ในการทดลองนี้ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ซึ่งแตกตัวให้คลอรีนในน้ำ ปกติแล้วปริมาณคลอรีนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในน้ำประปาจะอยู่ระหว่าง 5 – 10 ppm และเมื่อถึงผู้ใช้จะมีคลอรีนเหลืออยู่ประมาณ 0.5 – 1 ppm ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ระดับของคลอรีนที่ 1, 2, 5, 10 และ 15 ppm จากการทดลองพบว่า ปริมาณคลอรีนในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจสารพิษไมโครซิสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9992, 0.9990, 1.0000, 0.9989 และ 0.9961 ตามลำดับ (ภาพที่ 9) และในการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery มากกว่า 90% (ตารางที่ 12) และเมื่อคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเอง ค่า % recovery จะยังคงอยู่ในระดับสูงที่น่าพอใจ (ตารางที่ 13) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณคลอรีนสูงที่ระดับ 10 และ 15 ppm ค่าการดูดกลืนแสงค่อนข้างต่ำ 1.149 และ 1.076 เมื่อเทียบกับตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณคลอรีนต่ำ (0.5 – 5 ppm) จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า 1.2 ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการ bleaching effect ของคลอรีน อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจสารพิษไมโครซิสตินอย่างมีประสิทธิภาพในตัวอย่างน้ำที่มีการเติมคลอรีนในระดับไม่เกิน 15 ppm

ตารางที่ 12 ข้อวิพากษากลุ่มตัวอย่างที่ปรุงสำหรับปรุงรสอาหารที่ได้มาจาก ELISA kit เมื่อคำนวณจากการทดสอบพัฒนาต่อไป

จาก PBS

n = 10

Microcystin concentration (ppb)										% Recovery			
0					1					5			
Residual chlorine (ppm)		Conc. by ELISA		% Recovery	Ave Abs. 450 nm		Conc. by ELISA		% Recovery	Ave Abs. 450 nm		% Recovery	
PBS*	0.068	NA	NA	1.095	0.069	90.62	0.213	106.3	0.925	0.011	76.58	1.370	0.814
1	1.314	0.030	NA	NA	1.162	0.059	88.45	0.241	120.7	1.029	0.045	78.33	0.982
2	1.285	0.021	NA	NA	1.156	0.081	90.02	0.194	97.1	0.983	0.054	76.52	1.262
5	1.243	0.045	NA	NA	1.135	0.048	91.32	0.162	81.1	0.971	0.049	78.09	1.016
10	1.149	0.045	NA	NA	1.040	0.043	90.45	0.183	91.5	0.901	0.016	78.35	0.979
15	1.076	0.049	NA	NA	0.961	0.087	89.32	0.214	107.0	0.819	0.009	76.09	1.339

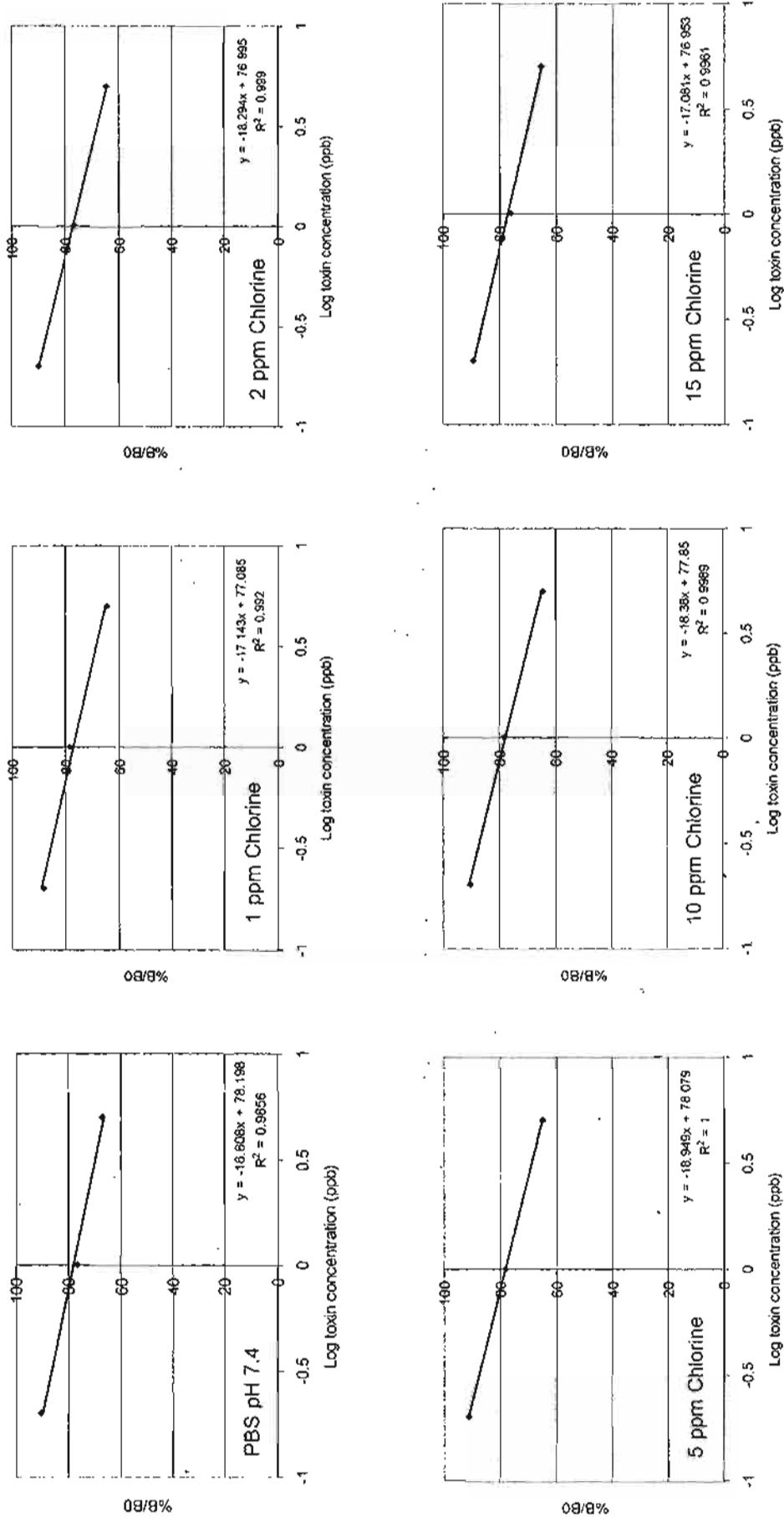
* Phosphate buffer solution pH 7.4; $R^2 = 0.9856$; $y = -16.608x + 78.198$

ตารางที่ 13 อิทธิพลของคลอรีนต่อประสิทธิภาพการวัดรูปแบบพิษไมโครซิสตินด้วย ELISA kit เมื่อความต้องการสมการทดสอบพันธุ์ขัง

ตามอย่าง

n = 12

	Microcystin concentration (ppb)																							
	0			0.2			1			5														
	Residual chlorine (ppm)	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	Conc. by ELISA	% Recovery	% Recovery	% B/B0	SD	Average	% Recovery	SD	% B/B0	Conc. by ELISA	% Recovery	% Recovery	
1	1.314	0.030	NA	NA	NA	1.162	0.059	88.45	0.217	108.7	0.045	78.33	0.846	84.6	0.847	0.033	64.48	0.696	108.7					
2	1.286	0.021	NA	NA	NA	1.156	0.081	90.02	0.194	97.1	0.983	0.054	76.52	1.062	106.2	0.828	0.017	64.45	6.731	97.1				
5	1.243	0.045	NA	NA	NA	1.135	0.048	91.32	0.200	100.0	0.971	0.049	78.09	0.999	99.9	0.806	0.010	64.83	6.381	100.1				
10	1.149	0.045	NA	NA	NA	1.040	0.043	90.45	0.206	103.2	0.901	0.016	78.35	0.939	93.9	0.744	0.014	64.75	6.450	103.2				
15	1.076	0.049	NA	NA	NA	0.961	0.087	89.32	0.189	94.4	0.819	0.009	76.09	1.123	112.3	0.704	0.019	65.44	5.862	94.4				



ภาพที่ 9 ผลการทดลองคร่าวๆ ค่าสัมประสิทธิ์ในสมการพื้นฐานในการตรวจวัดปริมาณสารพิษในตัวอย่างน้ำประปาโดยใช้เครื่องมือ ELISA kit คลอรีน 1, 2, 5, 10 และ 15 ppm ที่วัดคร่าวจะสอน

2.6 ผลของฟลูโอไรด์

ฟลูโอไรด์เป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการป้องกันฟันผุในเด็ก องค์กรอนามัยโลกและ UNICEF กำหนดว่าไม่ควรมีปริมาณในน้ำดื่มเกินกว่า 1 ppm เพราะอาจเป็นพิษและมีผลต่อการเกิดโรค fluorosis (การเกิดจุดดำหรือรอยด่างบนฟัน) อย่างไรก็ตามมักพบฟลูโอไรด์ปนเปื้อนอยู่ในน้ำดื่มนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคเหนือของประเทศไทย และมักตรวจพบในปริมาณที่สูงในน้ำบาดาลมากกว่าแหล่งน้ำจากพื้นผิว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ระดับของฟลูโอไรด์ที่ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ppm จากการทดลองพบว่าปริมาณฟลูโอไรด์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจ ELISA kit ในการตรวจสารพิษในครอซสติ๊น โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9920, 1.0000, 0.9932, 0.9989 และ 0.9991 ตามลำดับ (ภาพที่ 10) และในการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการทดสอบพันธุ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery สูงกว่า 90% (ตารางที่ 14) และเมื่อคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการทดสอบพันธุ์ของตนเอง ค่า % recovery จะยังคงอยู่ในระดับสูงที่น่าพอใจ (ตารางที่ 15) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจสารพิษในครอซสติ๊นอย่างมีประสิทธิภาพในแหล่งน้ำจดทั่วไปที่มีระดับการปนเปื้อนของฟลูโอไรด์ไม่เกิน 5 ppm ในกรณีที่น้ำมีระดับฟลูโอไรด์มากกว่า 5 ppm ไม่ควรนำมาใช้ในการบริโภคยกเว้นแต่ว่าจะมีระบบดูดซับฟลูโอไรด์ให้มีปริมาณลดลงจนอยู่ในระดับปลอดภัย

ตารางที่ 14 อัตราการตรวจจับของ ELISA kit ต่อปริมาณสารพิษในคราฟท์กระดาษที่ปริมาณสารพิษไม่ต่ำกว่า 5 ppb และพื้นที่

ตัวอย่าง PBS

n = 10

Microcystin concentration (ppb)																			
Fluoride (ppm)	0			0.2			1			5									
	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD							
	Conc. by ELISA	% Recovery	Conc. by ELISA	% Recovery	Conc. by ELISA	% Recovery	Conc. by ELISA	% Recovery	Conc. by ELISA	% Recovery	Conc. by ELISA	% Recovery							
PBS*	1.208	0.068	NA	NA	1.095	0.069	90.62	0.213	106.3	0.925	0.011	76.58	1.370	0.814	0.014	67.40	4.630	92.6	
0.5	1.307	0.030	NA	NA	1.191	0.109	91.14	0.172	86.2	1.026	0.062	78.53	0.891	89.1	0.863	0.042	66.03	4.535	90.7
1	1.252	0.029	NA	NA	1.126	0.058	89.95	0.201	100.6	0.960	0.031	76.65	1.139	113.9	0.802	0.011	64.09	5.842	116.8
2	1.260	0.033	NA	NA	1.135	0.048	90.12	0.197	98.4	0.993	0.056	78.84	0.855	85.5	0.803	0.010	63.77	6.087	121.7
3	1.296	0.019	NA	NA	1.172	0.041	90.48	0.188	94.0	1.019	0.039	78.64	0.878	87.8	0.847	0.019	65.36	4.953	99.1
5	1.290	0.024	NA	NA	1.135	0.050	88.01	0.259	129.5	0.978	0.028	75.81	1.270	127.0	0.803	0.015	62.29	7.389	147.8

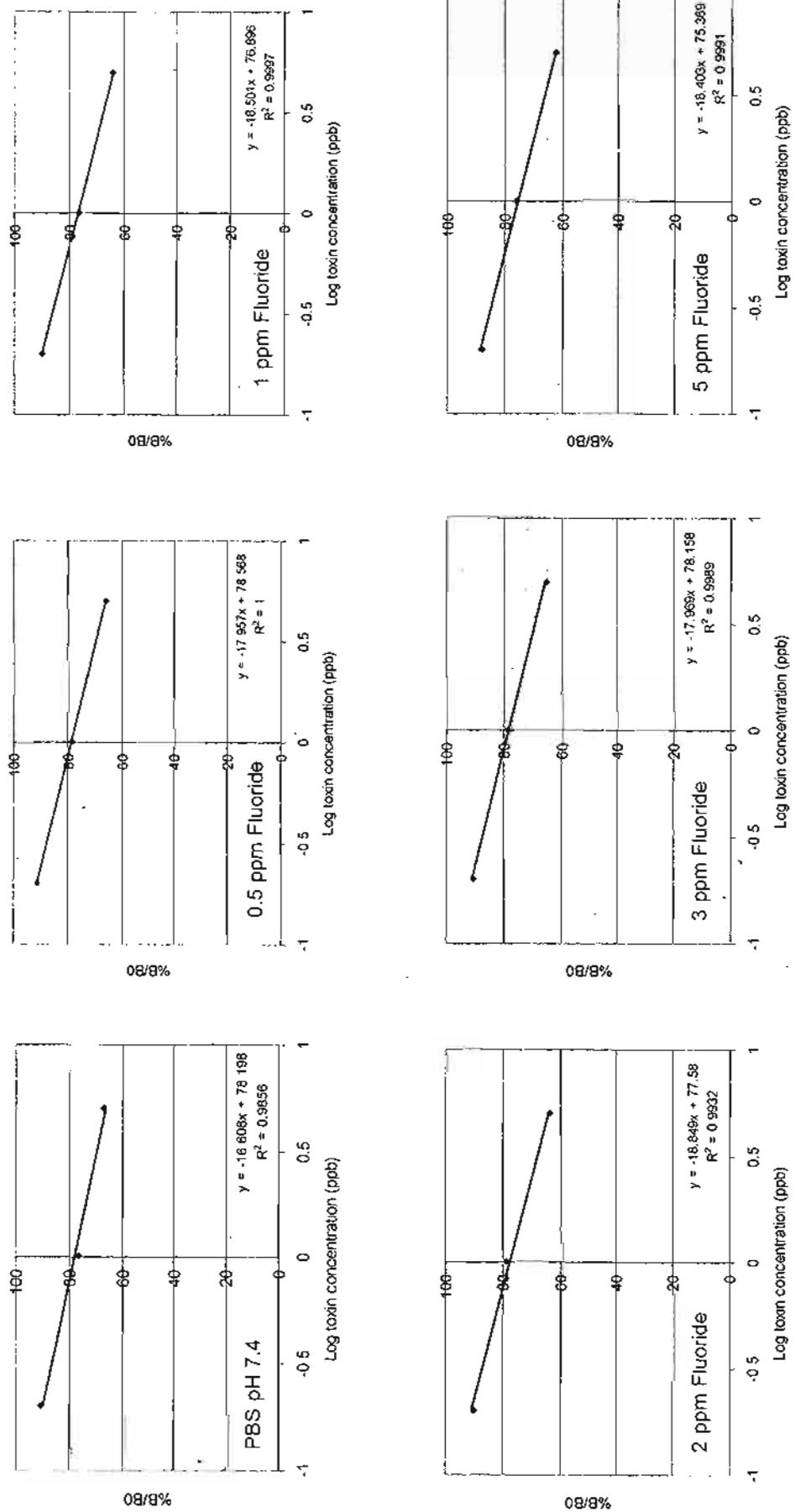
* Phosphate buffer solution pH 7.4; R² = 0.9856; y = -16.608x + 78.198

ตารางที่ 15 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษในตัวอย่างด้วย ELISA kit เมื่อคำนวณจากผลการทดสอบพันธุ์

ข่องทางเดียว

n = 12

Microcystin concentration (ppb)																			
0		0.2		1		5		% Recovery											
Fluoride (ppm)	% B/B ₀	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	Conc. by ELISA										
0.5	1.307	0.030	NA	NA	1.191	0.109	91.14	0.173	86.6	1.026	0.062	78.53	0.942	94.2	0.863	0.042	66.03	4.535	100.9
1	1.252	0.029	NA	NA	1.126	0.058	89.95	0.197	98.5	0.960	0.031	76.65	1.032	103.2	0.802	0.011	64.09	5.842	98.5
2	1.260	0.033	NA	NA	1.135	0.048	90.12	0.216	108.0	0.993	0.056	78.84	0.857	85.7	0.803	0.010	63.77	6.087	108.0
3	1.296	0.019	NA	NA	1.172	0.041	90.48	0.201	100.7	1.019	0.039	78.64	0.939	93.9	0.847	0.019	65.36	4.953	105.8
5	1.290	0.024	NA	NA	1.135	0.050	88.01	0.206	102.8	0.978	0.028	75.81	0.947	94.7	0.803	0.015	62.29	7.389	102.8



ภาพที่ 10 แสดงถึงส่วนของกราฟ ค่าตั้งมูลค่าสิทธิ์และสมการการทดสอบพัฒนาขั้นตอนการตรวจเชิงทางเคมีในตัวอย่างสำหรับตัวอย่างน้ำที่ปรุงระดับคุณภาพตามมาตรฐาน ผลโอลูร์ต 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ppm ด้วยชุดตรวจตอบ ELISA kit

3. การศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบในการวิเคราะห์สารพิษในครีซิติน เมื่อเก็บรักษาในถุงพลาสติกในสภาวะปกติ (normal pack) สภาพสูญญากาศ (vacuum pack) และในบรรยายกาศกําชีวนิโตรเจน (nitrogen pack) หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ในตู้ทึบแสง) และที่ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) แล้วนำชุดตรวจสอบมาทดสอบวิเคราะห์สารพิษหลังจากเก็บรักษาไว้ 1, 2, 3 และ 6 เดือน พนว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพไม่ว่าจะเก็บในถุงพลาสติกสภาวะใดก็ตาม โดยจะเห็นได้ชัดเจนว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของ negative control (0 ppb microcystin) มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องตามอายุการเก็บ จากค่าเริ่มต้นที่ 1.239 ที่ 0 เดือน ลดลงเป็น 0.270, 0.216, 0.114 และ 0.101 เมื่อเวลาผ่านไป 1, 2, 3 และ 6 เดือน ตามลำดับ (ตารางที่ 16) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากลักษณะเส้นกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) และสมการสหสัมพันธ์พบว่ามีลักษณะผิดปกติ โดยค่า R^2 ของผลการวิเคราะห์ที่ใช้ชุดตรวจสอบที่เก็บรักษาในถุงพลาสติกในสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง ลดลงจาก 0.9993 ที่ 0 เดือน ไปเป็น 0.8019, 0.7525, 0.8681 และ 0.1662 ในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 11) สำหรับการเก็บรักษาในสภาพสูญญากาศลดลงเป็น 0.9331, 0.7791, 0.5761 และ 0.2894 ในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 12) และในบรรยายกาศกําชีวนิโตรเจนที่อุณหภูมิห้องก็มีผลในทำนองเดียวกัน โดยลดลงเป็น 0.9271, 0.7791, 0.5761 และ 0.2894 ในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 13) ซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำไม่สามารถคำนวณปริมาณสารพิษและ % recovery ได้ (ตารางที่ 17 และตารางที่ 18)

ในการนี้ของการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของ negative control (0 ppb microcystin) ก็มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องตามอายุการเก็บเช่นกันแต่ลดลงในอัตราที่น้อยกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องอย่างเห็นได้ชัด โดยจากค่าเริ่มต้นที่ 1.239 ที่ 0 เดือน ลดลงเป็น 0.593, 0.478, 0.298 และ 0.224 เมื่อเวลาผ่านไป 1, 2, 3 และ 6 เดือนตามลำดับ (ตารางที่ 19) แต่ที่สำคัญคือลักษณะเส้นกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) และสมการสหสัมพันธ์พบว่ามีลักษณะปกติ โดยที่ค่า R^2 ของผลการวิเคราะห์ที่ใช้ชุดตรวจสอบที่เก็บรักษาในถุงพลาสติกในสภาวะปกติที่ 4 องศาเซลเซียส มีค่าค่อนข้างคงที่ในระดับสูงจาก 0.9993 ที่ 0 เดือน เป็น 0.9993, 0.9905, 0.9111 และ 0.9995 ในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 14) ซึ่งแสดงว่าปฏิกริยาในชุดตรวจสอบมีอัตราลดลงอย่างเป็นสัดส่วนกับระยะเวลาที่นานขึ้น นั่นหมายถึงว่าถึงแม้ปฏิกริยาจะลดลงที่อายุการเก็บ 6 เดือน โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เพียง 0.224 ก็ยังสามารถใช้ชุด ELISA kit นี้ในการตรวจสอบปริมาณสารพิษได้ เพียงแต่ว่าความเข้มของสีที่ได้ค่อนข้างตื้นและจำเป็นต้องใช้เครื่องอ่านผล ELISA reader ในการวิเคราะห์ จากการที่ค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) และสมการสหสัมพันธ์มีลักษณะที่ดี ทำให้สามารถคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จากชุดตรวจสอบที่ 0 เดือน ($y = -24.549x + 66.651$) ได้ในระดับที่มีค่า % recovery เก็บทั้งหมดอยู่ในระดับมากกว่า 60% (ตารางที่ 19) แต่ถ้าใช้สมการสหสัมพันธ์ของตนเองจากชุดตรวจสอบในแต่ละเดือนจะได้ค่า % recovery ที่อยู่ในระดับใกล้เคียง 100% (ตารางที่

20) ซึ่งแสดงว่าการเก็บรักษาชุดตรวจสอบในถุงพลาสติกในสภาพปอดที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บอย่างน้อย 6 เดือน และสามารถใช้ในการประเมินประมาณสารพิษในน้ำได้ ซึ่งถ้าต้องการผลที่น่าเชื่อถือขึ้น ควรจะวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อยืนยันทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ

สำหรับการเก็บรักษาชุดตรวจสอบที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยถุงพลาสติกในสภาพสุญญากาศและในบรรจุภัณฑ์ในโตรเจนก็ให้ค่าการดูดกลืนแสงของ negative control ลดลง เช่นกันแต่อยู่ในสัดส่วนที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บในบรรจุภัณฑ์ปอด โดยการเก็บในสภาพสุญญากาศมีค่าเป็น 0.628, 0.508, 0.336 และ 0.228 เมื่อเก็บนาน 1, 2, 3 และ 6 เดือน ตามลำดับ (ตารางที่ 21) ส่วนการเก็บในบรรจุภัณฑ์ในโตรเจนมีค่าเป็น 0.573, 0.371, 0.264 และ 0.238 ตามลำดับ (ตารางที่ 22) และเช่นเดียวกันค่าสัมประสิทธิ์สหสมพันธ์ของทั้งสองสภาพการเก็บก็สูงมากใกล้กับ 1 (ภาพที่ 15 และภาพที่ 16) ซึ่งแสดงว่าการเก็บทั้งสองแบบสามารถนำมาใช้ในการประเมินปริมาณสารพิษในตัวอย่างน้ำได้อย่างค่อนข้างแม่นยำ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า % recovery จากการคำนวณโดยใช้สมการสหสมพันธ์ของชุดที่เก็บไว้ 0 เดือน พบรากุดตรวจสอบที่เก็บในสภาพสุญญากาศมีค่าค่อนข้างต่ำ แต่ในชุดที่เก็บในบรรจุภัณฑ์ในโตรเจนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 60 % หรือสูงกว่า อย่างไรก็ตามถ้าทำการคำนวณปริมาณสารพิษโดยใช้สมการสหสมพันธ์ของตนอาจจะได้ค่า % recovery ใกล้เคียง 100% เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 21 และตารางที่ 24)

โดยสรุปจากการศึกษาพบว่าสภาพที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจหาสารพิษในโครชีสติน ได้แก่การเก็บในถุงพลาสติกปิดสนิท ภายใต้บรรจุภัณฑ์ในโตรเจน และต้องเก็บในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 16 ผลของการรากในถุงพลาสติกบรรจุแบบธรรมชาติ (normal pack) เก็บที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครไซส์ต้นตัวของตรวจ ELISA kit

Microcystin concentration (ppb)												
	0			0.2			1			5		
	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	SD	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	SD
0	1.239	0.053	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13
1	0.270	0.043	NA	NA	0.242	0.042	89.67	NC	NC	0.253	0.036	93.63
2	0.216	0.051	NA	NA	0.192	0.045	89.00	NC	NC	0.222	0.035	102.8
3	0.114	0.018	NA	NA	0.109	0.018	95.43	NC	NC	0.102	0.014	89.53
6	0.101	0.012	NA	NA	0.105	0.007	104.3	NC	NC	0.099	0.007	98.2

NA = Not applicable

NC = Not calculated

ตารางที่ 17 ผลของการวิเคราะห์ในถุงพลาสติกในสภาพ室อุณหภูมิห้อง (vacuum pack) เก็บที่ส่วนกลางห้อง (room temperature) ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครไซส์ติดตามมาตรฐาน ELISA kit

จำนวนตัวอย่าง (n)	Microcystin concentration (ppb)																	
	0				0.2				1									
	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Conc. by ELISA						
0	1.239	0.053	NA	NA	1.042	0.074	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13	1.050	105.0	0.616	0.035	49.75	4.881	97.6
1	0.174	0.053	NA	NA	0.154	0.024	88.07	NC	0.156	0.035	89.56	NC	NC	0.163	0.082	93.63	NC	NC
2	0.195	0.040	NA	NA	0.185	0.039	95.0	NC	0.187	0.031	95.8	NC	NC	0.229	0.059	117.4	NC	NC
3	0.089	0.023	NA	NA	0.076	0.007	85.84	NC	0.085	0.011	95.62	NC	NC	0.083	0.014	93.71	NC	NC
6	0.094	0.008	NA	NA	0.096	0.006	102.4	NC	0.102	0.006	108.8	NC	NC	0.089	0.016	95.0	NC	NC

NA = Not applicable

NC = Not calculated

ตารางที่ 18 ผลของอย่างการเก็บในถุงพลาสติกบันทุรกุญแจในบรรจุภัณฑ์ในห้อง (nitrogen pack) เก็บที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไม่ได้รับตัวชุดตรวจ ELISA kit

Microcystin concentration (ppb)									
	0	0.2	1	5	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	Conc. by ELISA	% B/B ₀	% Recovery
0	1.239	0.053	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6
1	0.211	0.038	NA	NA	0.258	0.040	122.5	NC	0.279
2	0.211	0.038	NA	NA	0.199	0.031	94.4	NC	0.241
3	0.099	0.021	NA	NA	0.096	0.011	97.57	NC	0.093
6	0.107	0.012	NA	NA	0.110	0.012	102.5	NC	0.107
									99.4
								NC	0.107
								NC	99.9
								NC	NC

NA = Not applicable

NC = Not calculated

ตารางที่ 19 ผลของอุปกรณ์ในการเก็บในถุงพลาสติกบรรจุแบบธรรมด้า (normal pack) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ต่อประสิทธิภาพการวัดรากที่ปริมาณสารพิษไม่ได้รีเซ็ต
ตัวอย่างตัวตรวจสอบ ELISA kit [โดยการคำนวณจากสมการทดสอบพัฒนาของชุด ELISA ที่อยู่ในการเก็บ 0 ต่อ 0 ที่มี $R^2 = 0.9993$ และ $y = -24.549x + 66.651$

$n = 12$

Microcystin concentration (ppb)													
	0			0.2			1			5			
	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	SD
0	1.239	0.053	NA	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13
1	0.593	0.056	NA	NA	NA	0.500	0.030	84.26	0.192	95.8	0.387	0.034	65.22
2	0.478	0.021	NA	NA	NA	0.419	0.010	87.70	0.139	69.4	0.346	0.014	72.36
3	0.298	0.078	NA	NA	NA	0.262	0.060	87.96	0.137	68.4	0.248	0.055	83.26
6	0.224	0.026	NA	NA	NA	0.195	0.019	87.21	0.145	72.7	0.156	0.013	69.95

NA = Not applicable

ตารางที่ 20 ผลของการทดสอบตัวอย่างน้ำในชุดตรวจเชิงรุก normal pack) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ต่อไปรักษาตัวอย่างไว้ในตู้เย็น 1 วัน ก่อนนำไปทดสอบ ELISA kit [โดยการคำนวณจากสูตรของ ELISA kit]

n = 12

	Microcystin concentration (ppb)																		
	0				0.2				1				5						
	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery			
0	1.239	0.053	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13	1.050	105.0	0.616	0.035	49.75	4.881	97.6
1	0.593	0.056	NA	NA	0.500	0.030	84.26	0.195	97.7	0.387	0.034	65.22	1.049	104.9	0.283	0.013	47.80	4.862	97.6
2	0.478	0.021	NA	NA	0.419	0.010	87.70	0.219	109.6	0.346	0.014	72.36	0.834	83.4	0.243	0.010	50.75	5.479	109.6
3	0.298	0.078	NA	NA	0.262	0.060	87.86	0.267	133.7	0.248	0.055	83.26	0.560	56.0	0.202	0.027	67.83	6.684	133.7
6	0.224	0.026	NA	NA	0.195	0.019	87.21	0.204	102.1	0.156	0.013	69.95	0.959	95.9	0.115	0.010	51.30	5.105	102.1

NA = Not applicable

ตารางที่ 21 ผลของอย่างการเก็บในถุงพลาสติกบรรจุในสภาพสูญญากาศ (vacuum pack) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ต่อไปสักวันสองวัน ELISA kit ตรวจตัวชุดตรวจตัวชุด ELISA kit ทดสอบการหลั่งพัฒนาของตัว ELISA ที่อยู่ในสภาพการเก็บห้องตู้เย็น 0 เดือน ที่นี่ $R^2 = 0.9993$ และ $y = -24.549x + 66.651$

$n = 12$

Microcystin concentration (ppb)																			
0					1														
Sample (140H)	Ave Abs. 450 nm	% Recovery	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% Recovery	Conc. by ELISA	Ave Abs. 450 nm	% Recovery	Conc. by ELISA										
0	1.239	0.053	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13	1.050	105.0	0.616	0.035	49.76	4.881	97.6
1	0.628	0.026	NA	NA	0.562	0.028	89.37	0.119	59.4	0.466	0.054	74.11	0.497	49.7	0.374	0.015	59.58	1.941	38.8
2	0.508	0.025	NA	NA	0.462	0.044	91.02	0.102	50.8	0.407	0.030	80.16	0.282	28.2	0.323	0.026	61.22	1.664	33.3
3	0.336	0.067	NA	NA	0.327	0.027	97.23	0.057	28.4	0.273	0.019	81.27	0.254	25.4	0.216	0.012	68.39	0.849	17.0
6	0.228	0.010	NA	NA	0.209	0.012	91.83	0.094	47.1	0.169	0.010	74.18	0.494	49.4	0.127	0.005	52.70	3.700	74.0

NA = Not applicable

ตารางที่ 22 ผลของการทดสอบตัวอย่างในสภาวะถุงญากาศ (vacuum pack) เก็บห้องห่าวนิ 4°C ต่อประสิทธิภาพการวัดคราฟท์ปริมาณสารพิษไมโครคีโนสติกตัวบูตตรวจโดย ELISA kit [โดยการคำนวณจากการทดสอบพัฒนาขึ้นของ]

Microcystin concentration (ppb)																			
		0		0.2		1		5											
		Ave Abs. 450 nm	% B/B0	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	Ave Abs. 450 nm	% B/B0	Average	% Recovery										
		Conc. by ELISA	SD	Conc. by ELISA	SD	Conc. by ELISA	SD	Conc. by ELISA	% Recovery										
0	1.239	0.053	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13	1.050	0.616	0.035	49.75	4.881	97.6	
1	0.628	0.026	NA	NA	0.562	0.028	89.37	0.197	98.7	0.466	0.054	74.11	1.027	102.7	0.374	0.015	59.58	4.935	98.7
2	0.508	0.025	NA	NA	0.462	0.044	91.02	0.231	115.6	0.407	0.030	80.16	0.748	74.8	0.323	0.026	61.22	5.782	115.6
3	0.336	0.067	NA	NA	0.327	0.027	97.23	0.189	94.3	0.273	0.019	81.27	1.121	112.1	0.216	0.012	68.39	4.716	94.3
6	0.228	0.010	NA	NA	0.209	0.012	91.83	0.211	105.4	0.169	0.010	74.18	0.901	90.1	0.127	0.005	52.70	5.269	105.4

NA = Not applicable

ตารางที่ 23 ผลของanalytical recovery ในบรรยายการสำรองใน袋子 (nitrogen pack) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ต่อประสิทธิภาพการวัดคราฟท์เพริเม่าสารพิษไม่ทราบตัวยานั้นตรวจสอบ ELISA kit โดยการคำนวณจากสมการสัมพันธ์ของคราฟท์ ELISA ที่อยู่กราฟบน 0 เต็มที่มี $R^2 = 0.9993$ และ $y = -24.549x + 66.651$

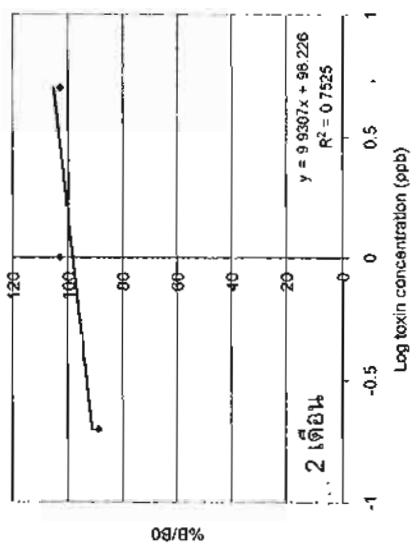
Microcystin concentration (ppb)									
0					0.2				
	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Average
	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
0	1.239	0.053	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6
1	0.573	0.029	NA	NA	0.441	0.076	77.08	0.376	187.9
2	0.371	0.086	NA	NA	0.331	0.028	89.32	0.119	59.6
3	0.264	0.023	NA	NA	0.227	0.027	85.97	0.163	81.7
6	0.238	0.022	NA	NA	0.212	0.023	89.13	0.121	60.7
									67.3
									53.71
									3.365
									4.881
									97.6

NA = Not applicable

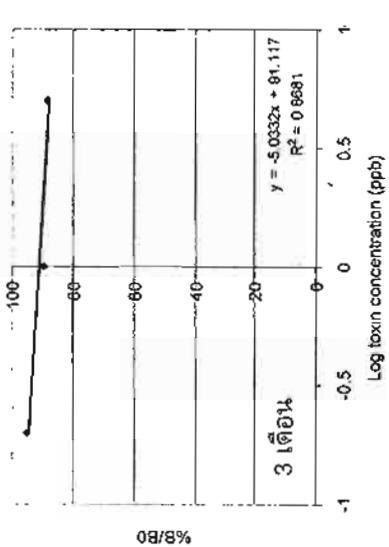
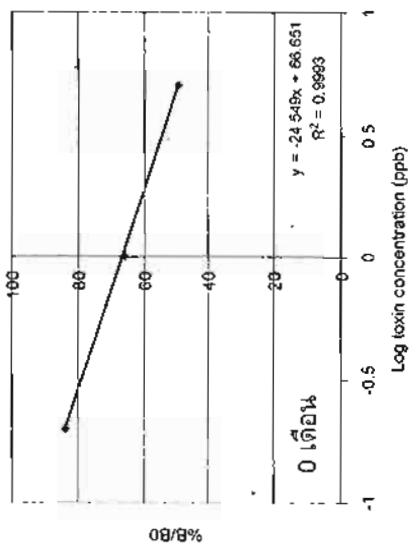
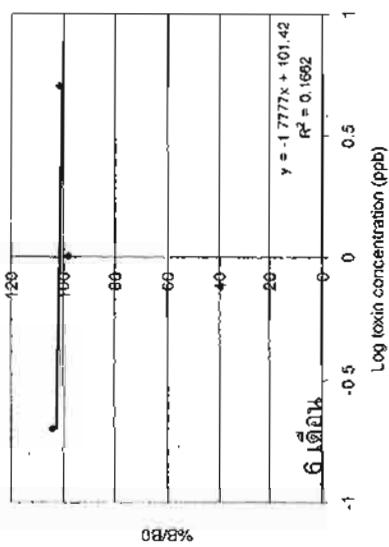
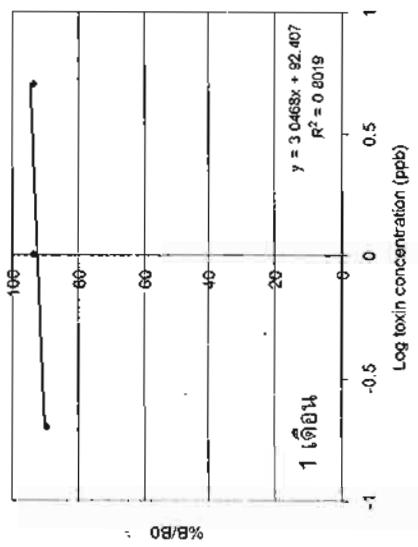
ตารางที่ 24 ผลของการรักษาในถุงบรรจุไนโตรเจน (nitrogen pack) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ต่อประสิทธิภาพการวัดระดับปริมาณสารพิษไมโครไซต์ติดตัวบีดูตราชาก ELISA.kit โดยการคำนวณจากการทดสอบพันธุ์ของตัวอย่าง

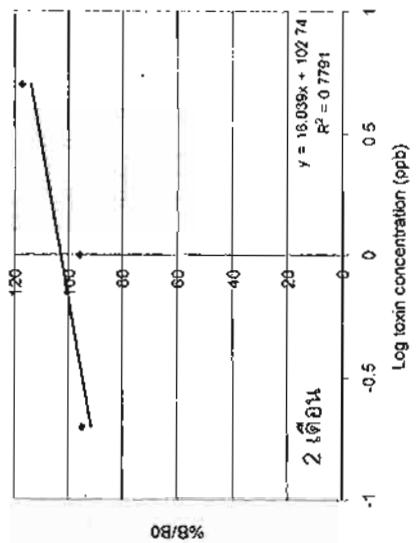
ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่)	Microcystin concentration (ppb)																		
	0	0.2	1	5	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	Conc. by ELISA	% B/B ₀	SD	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	Conc. by ELISA	% B/B ₀	SD	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	
0	1.239	0.053	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13	1.050	105.0	0.616	0.035	49.75	4.881	97.6
1	0.573	0.029	NA	NA	0.441	0.076	77.08	0.200	99.8	0.361	0.047	63.00	1.004	100.4	0.281	0.029	49.03	4.990	99.8
2	0.371	0.086	NA	NA	0.331	0.028	89.32	0.203	101.3	0.262	0.081	70.58	0.974	97.4	0.189	0.049	50.89	5.066	101.3
3	0.264	0.023	NA	NA	0.227	0.027	85.97	0.212	106.1	0.183	0.036	69.28	0.888	88.8	0.128	0.026	48.43	5.307	106.1
6	0.238	0.022	NA	NA	0.212	0.023	89.13	0.187	93.7	0.165	0.010	69.28	1.138	113.8	0.128	0.013	53.71	4.686	93.7

NA = Not applicable

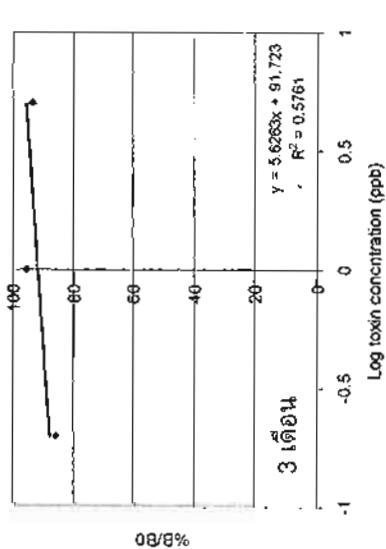
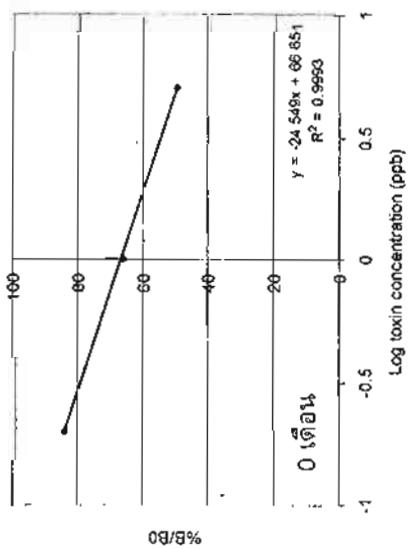
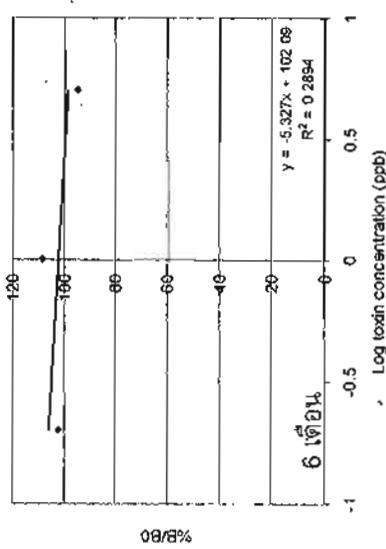
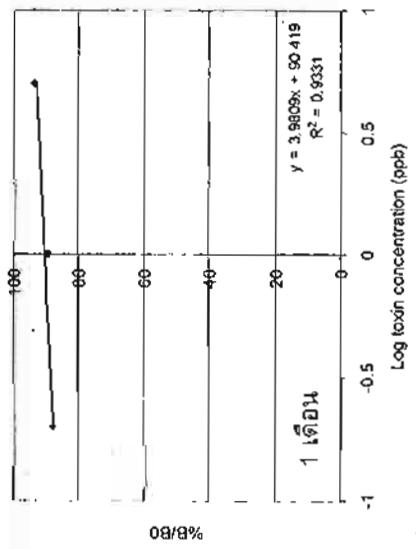


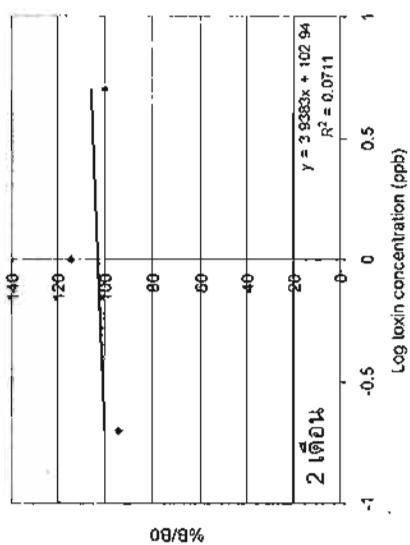
ภาพที่ 11 แสดงผลการทดสอบค่าสมดุลของสารพิษในสัตว์ทดลอง สมการทดสอบพื้นนี้ ของผลการวัดเคราะห์สารพิษไม่corrected หมายความว่าจากการตรวจตัวอย่างครัวเรือนจะพบสารพิษในปริมาณมากกว่าที่ ELISA kit ที่บรรจุในถุงพลาสติกแบบมาตรฐาน (normal pack) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง



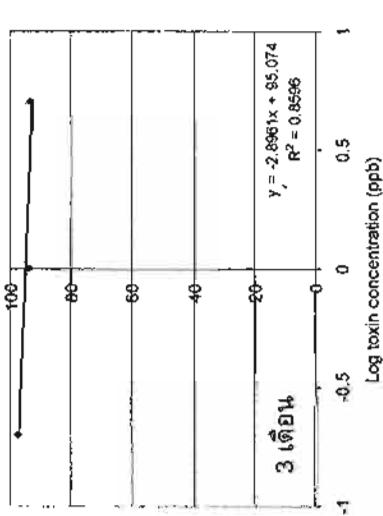
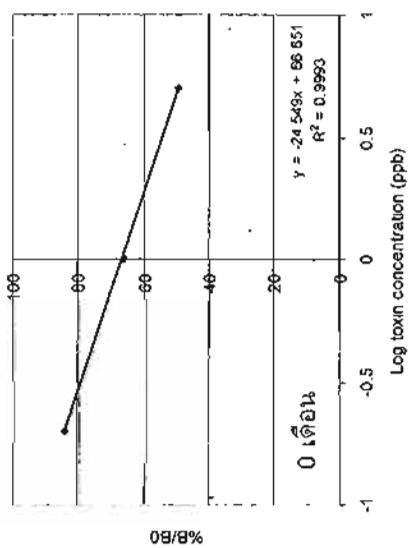
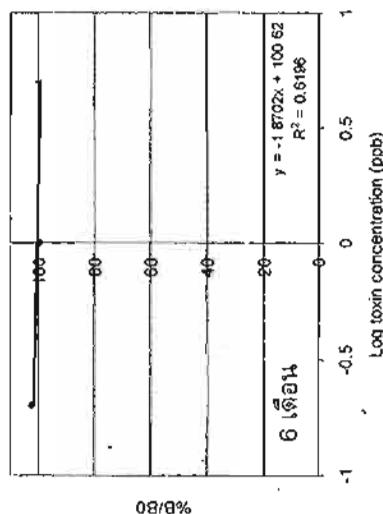
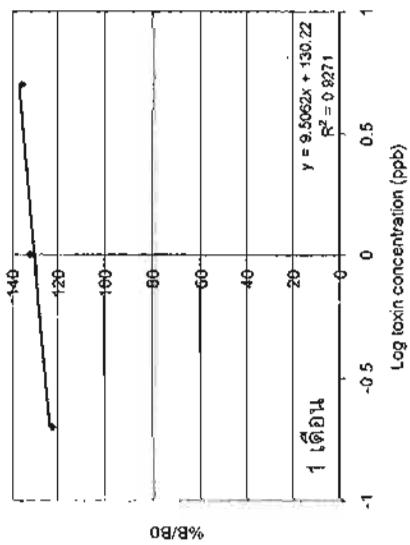


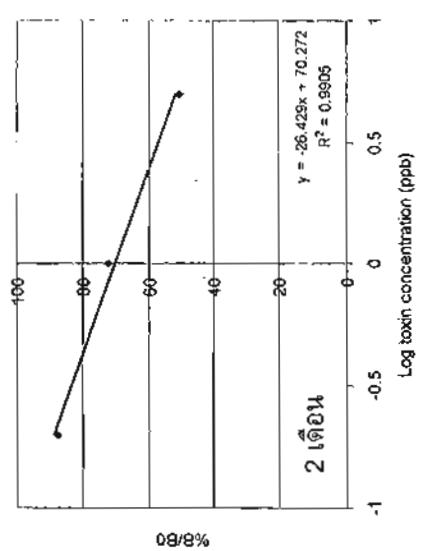
ภาพที่ 12 แสดงถึงผลการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์และสมการทดสอบพื้นที่ของผลการวิเคราะห์สารพิษในครีสตินามาตรฐานจากการตรวจด้วยชุดตรวจ ELISA kit ที่บรรจุในถุงพลาสติกแบบสูญญากาศ (vacuum pack) เลี้ยวเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง



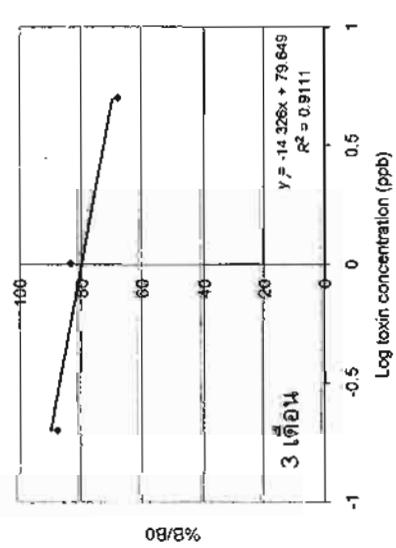
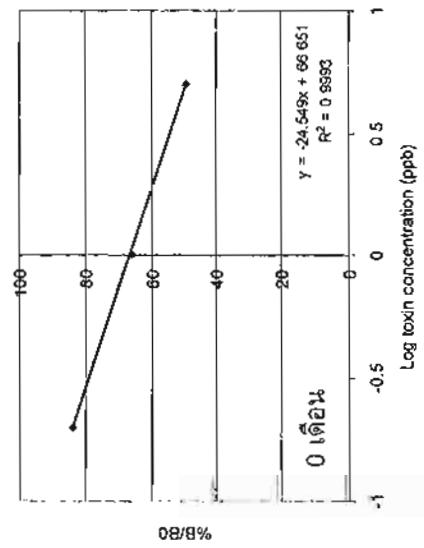
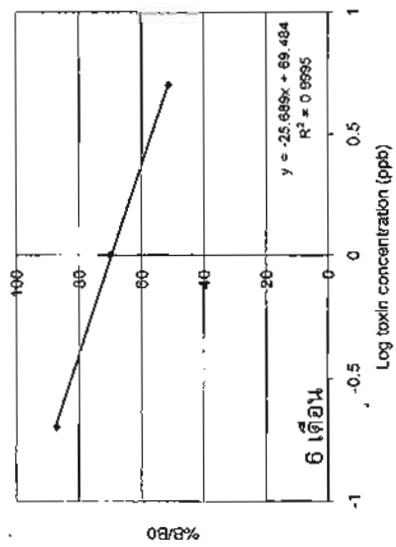
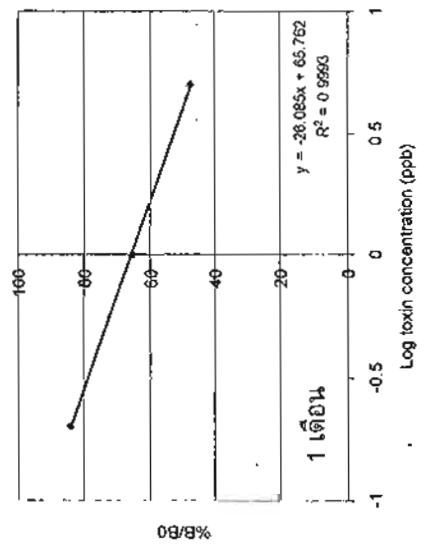


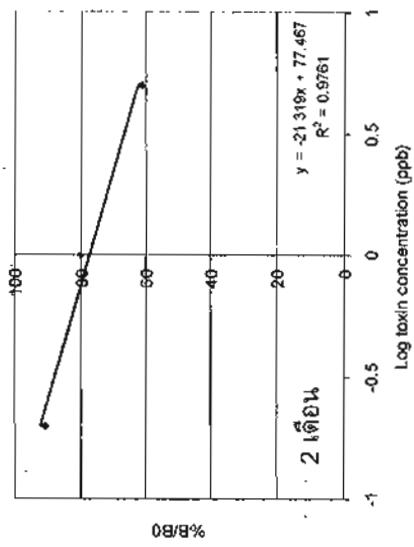
ภาพที่ 13 แสดงผลการทดสอบ ค่าสัมประสิทธิ์เส้นตรงสมการเส้นตรง ของผลกระทบต่อการรักษาสารพิษในโครงสร้างตัวตรวจจับจากการติดต่อชุดตรวจโดย ELISA Kit ที่บรรจุในชุดตรวจและตัวอย่างที่อยู่ในกล่อง (kitrogen pack) และวิธีนี้รักษาที่อุณหภูมิห้อง



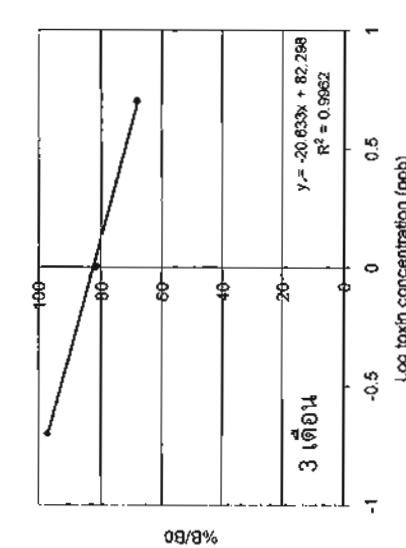
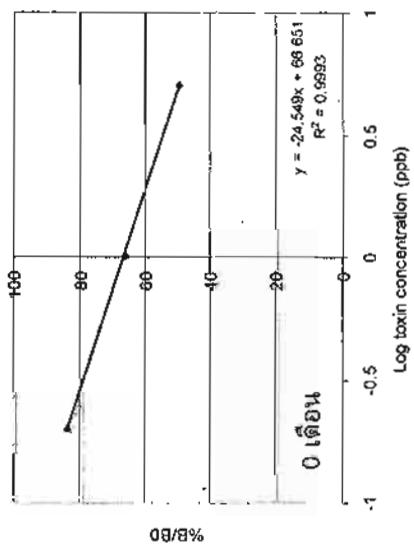
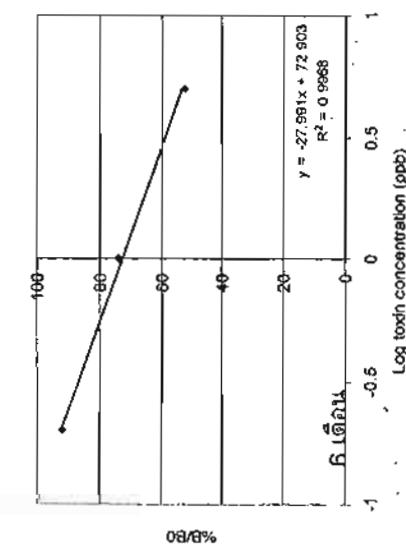
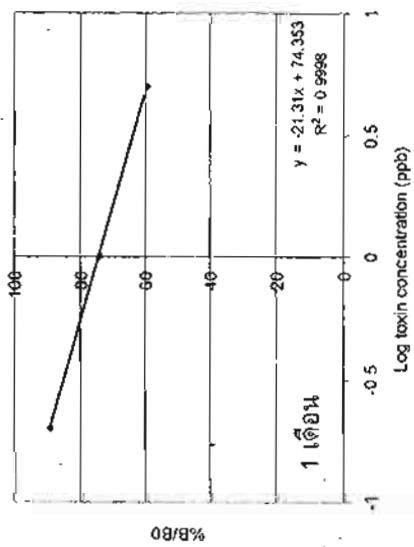


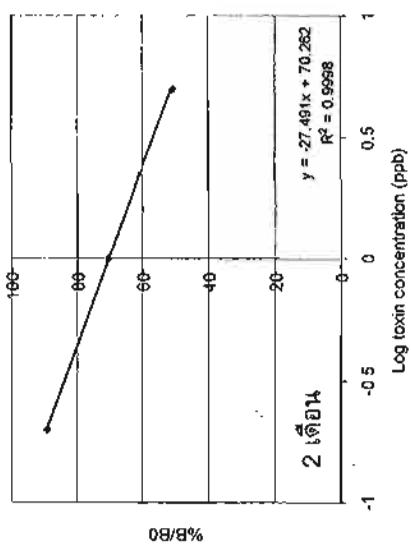
ภาพที่ 14 ผลต่อสัดส่วนของสารพิษในน้ำ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการพหุ項พิมพ์ ของผลการวิเคราะห์สารพิษไม่ทราบศัตรูตามมาตรฐานจากการตรวจด้วยชุดตรวจ ELISA kit ที่บรรจุในถุงพลาสติกแบบบรรจุภัณฑ์ normal pack และเก็บรักษาที่ 4°C



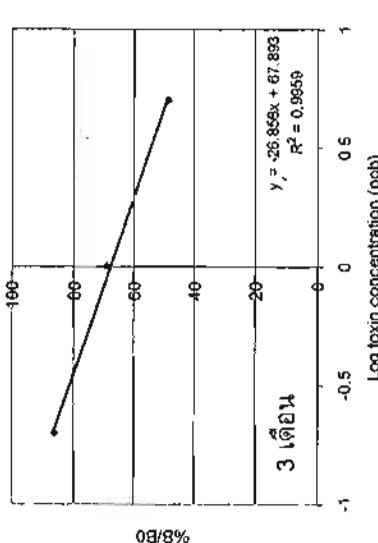
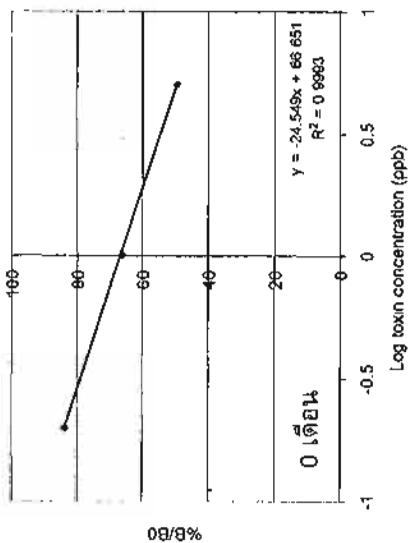
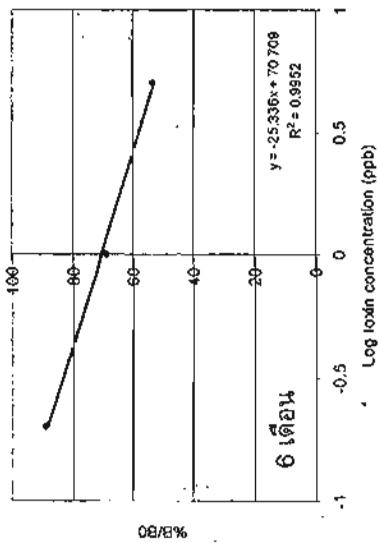
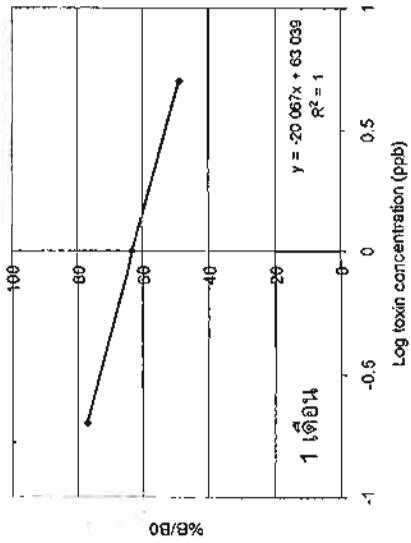


ภาพที่ 15 แสดงถึงการทดลองค่าสัมประสิทธิ์เบลล์
สมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์
สารพิษไมโครชิลเดอร์ชีวนานาจักษณ์
ตราจัตต์วัวซูตรัวจส่วน ELISA kit ที่
บรรจุในถุงพลาสติกแบบสูญญากาศ
(vacuum pack) และเก็บรักษาที่ 4°C





ภาพที่ 16 แสดงถึงการทดสอบ ค่ารั้งประสีก์และ
สมการทดสอบพัฒนา ช่วยเหลือการวิเคราะห์
สารพิษไม่ทราบต้นมาตรวัดฐานจากการ
ตรวจด้วยชุดตรวจ ELISA kit ที่
บรรจุในถุงพลาสติกในบรรจุภัณฑ์
ไนโตรเจน (nitrogen pack) และเก็บ
รักษาที่ 4°C



4. การประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

การตรวจปัจมานสารพิษในระบบผลิตน้ำประปาได้ดำเนินการที่ โรงพยาบาลน้ำบางเขน การประปานครหลวง และโรงพยาบาลน้ำบางพระ สำนักงานประปาเขต 1 การประปาส่วนภูมิภาค โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำในกระบวนการผลิต 4 จุด ๆ ละ 3 ขี้ ได้แก่

1. น้ำดื่ม
2. โรงสูบน้ำดื่ม
3. ถังตักตะกรอน
4. น้ำประปา

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำของโรงพยาบาลน้ำบางเขนด้วยวิธี ELISA kit พบร่วด้วยน้ำดื่มและจากโรงสูบน้ำดื่มมีปริมาณสารพิษในโครงสร้างเล็กน้อย ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ที่องค์กรอนามัยโลกกำหนดไว้ที่ 1 ppb อย่างไรก็ตามค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า detection limit เนื่องจากเป็นผลของการคำนวณเจ้มไม่น่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามได้นำตัวอย่างน้ำดื่ม (3) ซึ่งตรวจพบในโครงสร้าง 0.19 ppb ไปวิเคราะห์ด้วย LC/MS ซึ่งก็ไม่พบสารพิษแต่อย่างใด

สำหรับตัวอย่างน้ำจากโรงพยาบาลน้ำประปาเมื่อตรวจด้วย ELISA kit พนสารพิษในโครงสร้างติดในตัวอย่างน้ำดื่ม และจากโรงสูบน้ำดื่มในระดับ 0.21 – 0.68 ppb จึงนำตัวอย่างเหล่านี้ไปตรวจวิเคราะห์ยืนยันด้วย LC/MS ก็สามารถวิเคราะห์ผลออกมากได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับ ELISA kit ยกเว้น 2 ตัวอย่างจาก ห้องทดลอง 6 ตัวอย่าง ที่ให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ผลิตขึ้นมาสามารถนำไปใช้จริงในระบบผลิตน้ำประปา

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษในโครงซิสตินด้วยวิธี ELISA กับ LC/MS
ในตัวอย่างน้ำจากระบบผลิตน้ำประปาของโรงกรองน้ำบางเขน การประปากรุงเทพฯ

n = 12

ลำดับ ที่	จุดเก็บตัวอย่าง	Microcystin Conc. (ppb)		Remarks
		ELISA*	LC/MS**	
1.	น้ำดื่ม (1)	0.05	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
2.	น้ำดื่ม (2)	0.08	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
3.	น้ำดื่ม (3)	0.19	ND	
4.	โรงสูบน้ำดื่ม (1)	ND	NA	
5.	โรงสูบน้ำดื่ม (2)	0.04	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
6.	โรงสูบน้ำดื่ม (3)	0.06	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
7.	ถังตักตะกอน (1)	ND	NA	
8.	ถังตักตะกอน (2)	ND	NA	
9.	ถังตักตะกอน (3)	ND	NA	
10.	น้ำประปา (1)	ND	NA	
11.	น้ำประปา (2)	ND	NA	
12.	น้ำประปา (3)	ND	NA	

* ใช้ตัวอย่างน้ำโดยตรง ** ตรวจวิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างที่ให้ผลบวกจาก ELISA kit

ND = Not detected, NA = Not applicable

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษในโครงซิสตินด้วยวิธี ELISA กับ LC/MS ในด้วยอย่างน้ำจากระบบการผลิตน้ำประปาของโรงกรองน้ำบางพระ การประปาส่วนภูมิภาค

n = 12

ลำดับ ที่	จุดเก็บด้วยอย่าง	Microcystin Conc. (ppb)		Remarks
		ELISA*	LC/MS**	
1.	น้ำดื่ม (1)	0.38	0.49	
2.	น้ำดื่ม (2)	0.49	0.57	
3.	น้ำดื่ม (3)	0.68	0.47	
4.	โรงสูบน้ำดื่ม (1)	0.24	0.08	
5.	โรงสูบน้ำดื่ม (2)	0.32	ND	
6.	โรงสูบน้ำดื่ม (3)	0.21	0.11	
7.	ถังคงตากอน (1)	0.05	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
8.	ถังคงตากอน (2)	0.07	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
9.	ถังคงตากอน (3)	ND	NA	
10.	น้ำประปา (1)	ND	NA	
11.	น้ำประปา (2)	ND	NA	
12.	น้ำประปา (3)	ND	NA	

* ใช้ด้วยอย่างน้ำโดยตรง ** ตรวจวิเคราะห์เฉพาะด้วยอย่างที่ให้ผลบวกจาก ELISA kit

ND = Not detected, NA = Not applicable

5. การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการประชุมเชิงปฏิบัติการ

การจัดประชุมเชิงปฏิบัติการการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA kit ให้กับบุคลากรของหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การประปาครหลง การประปาส่วนภูมิภาค สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ในหัวข้อ Analysis of Microcystin in Water by LC/MS and ELISA Kit ได้จัดขึ้นระหว่างวันที่ 1 – 3 สิงหาคม 2549 ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน โดยมีวัตถุประสงค์

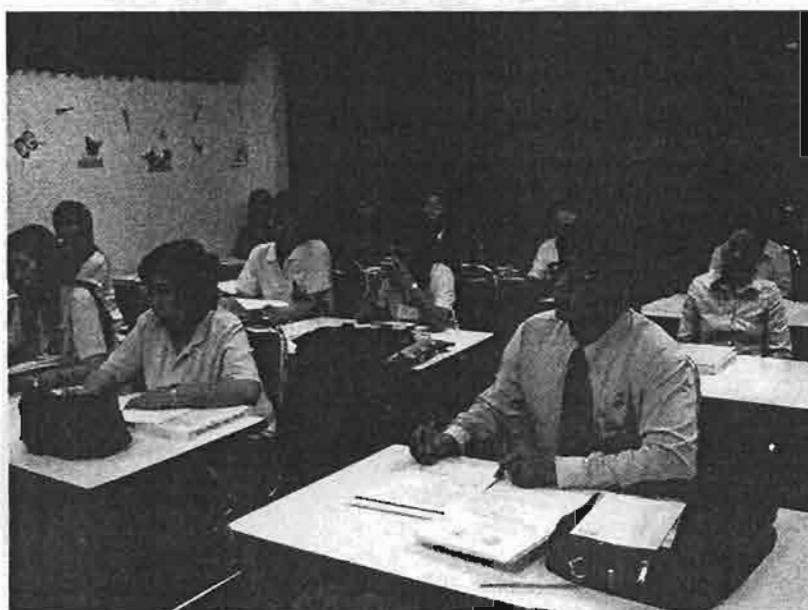
1. เพื่อพัฒนาขีดความสามารถด้านการวิเคราะห์สารพิษในโครงซิสตินให้กับนักวิชาการจากหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมคุณภาพน้ำ

2. เพื่อแนะนำและใช้ชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่พัฒนาจากโครงการในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารพิษในโครงซิสตินในแหล่งน้ำที่ใช้ในการอุปโภค-บริโภค

โดยในการประชุมประกอบด้วยภาคบรรยาย 1 วัน และภาคปฏิบัติ 2 วัน ซึ่งมีผู้เข้าร่วมการประชุมทั้งหมด 19 คน ประกอบด้วยนักวิชาการจาก

1. การประปานครหลวง 6 คน
2. การประปาส่วนภูมิภาค 4 คน
3. สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค 7 คน
4. การไฟฟ้าฝ่ายผลิต 2 คน

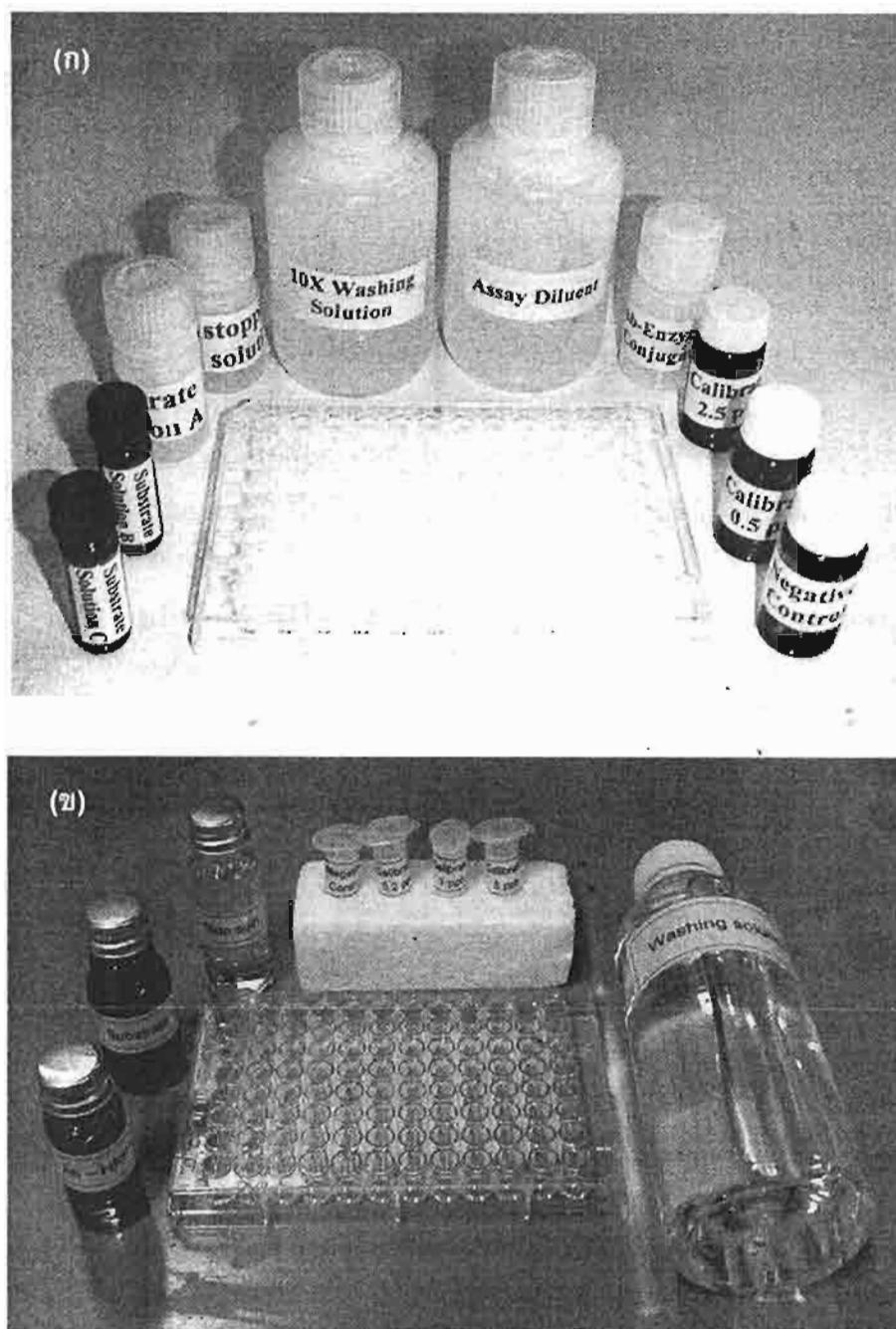
โดยผู้เข้าร่วมประชุมทุกคนแสดงความพอใจในประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่พัฒนาจากโครงการนี้ และมีความประสงค์ที่จะนำไปใช้ในหน่วยงานของตน



ภาพที่ 17 ภาพการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Analysis of Microcystin in Water by LC/MS and ELISA Kit ระหว่างวันที่ 1 – 3 สิงหาคม 2549 ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การปรับปรุงชุดตรวจสอบ ELISA kit ให้มีขนาดกะทัดรัด

ในการปรับปรุงชุดตรวจสอบ ELISA kit ได้ทำการลดขนาดของขวดบรรจุให้เหมาะสม และใช้ substrate ที่เดิมประกอบด้วยน้ำยา 3 ชนิด มาเป็นน้ำยาสำเร็จรูป SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) ของ KPL, Inc. (Maryland, USA) ทำให้ชุดตรวจสอบมีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 เปรียบเทียบส่วนประกอบของ ELISA kit ชุดต้นแบบ (ก) กับชุดที่ได้รับการปรับปรุง (ข)

สรุปผลการทดลอง

1. ชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ได้ผลิตขึ้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง และได้ผลเป็นที่น่าพอใจยิ่ง โดยประสิทธิภาพในการตรวจวัดมีความไวสูงกว่าวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ HPLC เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้โดยตรง (ไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษจากตัวอย่างปริมาณมากเหมือน HPLC) และสามารถใช้ได้เป็นอย่างดีสำหรับการเฝ้าระวังการบันเบื้องของสารพิษในแหล่งน้ำต่างๆ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณยังจำต้องใช้ HPLC เป็นหลัก เนื่องจากชุดตรวจสอบที่ได้มาจากการใช้ polyclonal antibody

2. ชุดตรวจสอบนี้สามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินได้ผลเป็นอย่างดี ในตัวอย่างน้ำที่มีลักษณะดังต่อไป

- pH อยู่ในช่วง 5.5 – 7.5
- ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่เกิน 100 mM หรือ 10 ppt
- ระดับความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมไม่เกิน 100 mM
- ระดับความเข้มข้นของเหล็กในรูปออกซิไดซ์ไม่เกิน 10 mM
- คลอรินและฟลูโโรไโตร์ในระดับปกติไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

3. สภาวะการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่เหมาะสม คือบรรจุ antibody coated microwell plate ในถุงพลาสติกภายใต้บรรยายกาศในครัวเรือน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส (รวมทั้งน้ำยาอื่นๆ) จะสามารถรักษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบได้นาน 6 เดือน โดยอาจจะมีการลดลงของความไวต่อสารพิษบ้างเล็กน้อย

4. สามารถนำชุดตรวจสอบ ELISA kit ไปประเมินระดับของสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำจากการนับผลลัพธ์ได้ประมาณ 10 นาที ซึ่งสามารถยืนยันผลได้จากการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

5. จากการนำชุดตรวจสอบนี้ไปใช้ในการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการให้กับนักวิชาการจากการประปาครุหลวง การประปาส่วนภูมิภาค สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ได้รับการยอมรับว่าสามารถนำไปใช้ได้จริง

ภาคผนวก

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสูบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษในโครงสร้างต้น
- เพื่อผลิตชุดตรวจสูบ ELISA kit สำหรับตรวจหาสารพิษในโครงสร้างต้นเชิงพาณิชย์

กลที่ได้รับตลอดโครงการ

ได้ผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ทั้ง 2 ประการ

บทความสำหรับเผยแพร่

ปัจจุบันไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษเป็นปัญหาสำคัญส่งผลกระทบต่อความเจ็บป่วยของมนุษย์และการตายของสัตว์เลี้ยงหลายแห่งทั่วโลก เช่น การรายงานการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ในประเทศไทย (อาการดันและคณะ 2542) การเกิดโรคดันอักเสบระบาดอย่างรุนแรง ในประชากรใน Palm Island รัฐ Queens land ประเทศออสเตรเลีย (Baurke และคณะ, 1983) การเกิดมะเร็งตับระยะเริ่มต้น ของประชากรในประเทศจีน (Delong, 1979 และ Yn, 1989) เป็นต้น ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษนี้ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Microcystis* และ *Nodularia* โดยสามารถตรวจโดยวิธีเดินโดรดเร็วในแหล่งน้ำจืดทั่วไป และจะปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่นำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อม และมีผลกระทบต่อนิเวศวิทยาอย่างกว้างขวาง

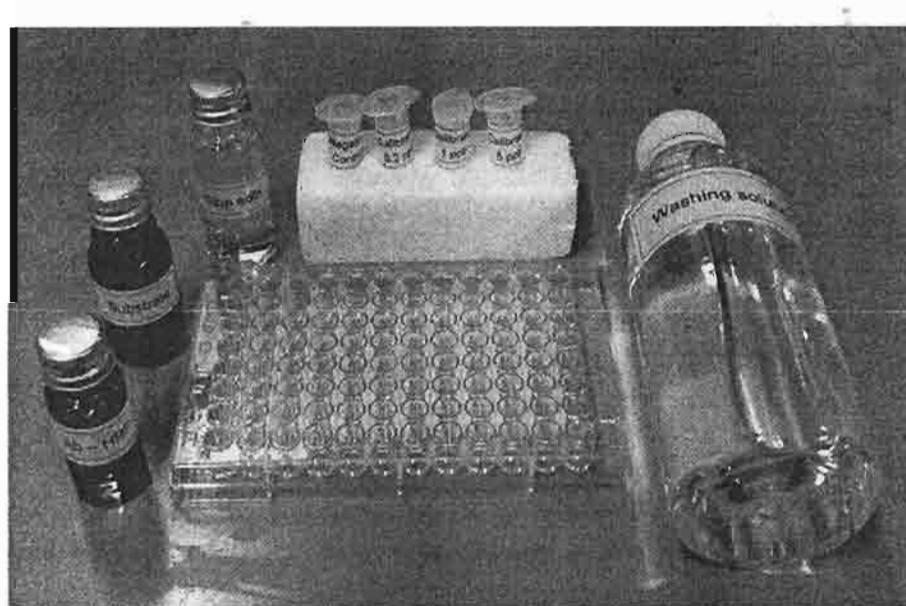
ปัญหานี้การปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษดังกล่าวในแหล่งน้ำจืดเป็นปัญหาใหม่ที่หน่วยงานต่างๆ กำลังให้ความสนใจและเร่งดำเนินการแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตน้ำเพื่อการบริโภคให้ปลอดจากสารพิษเป็นปัญหาสำคัญอันหนึ่งที่จำเป็นต้องเร่งศึกษา เนื่องจากสารพิษถูกกำจัดได้ยากในกระบวนการการผลิตน้ำประปา มีรายงานว่าสามารถตรวจพบสารพิษไม่procusticin จากไซยาโนแบคทีเรียนได้ในน้ำประปาของประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย ด้วยการใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เทคนิค ELISA และทดสอบความเป็นพิษกับหนู (Chorus and Bartram, 1999) ซึ่งองค์การอนามัยโลก (WHO) จึงได้มีข้อกำหนดค่าความปลอดภัยสำหรับการปนเปื้อนของสารพิษ microcystin LR and equivalent ได้ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อลิตรในน้ำดื่ม

สำหรับข้อมูลในประเทศไทยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียผลิตสารพิษสายพันธุ์ที่สำคัญ (dominant species) เป็นไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Microcystis aeruginosa* โดยตรวจพบในแหล่งน้ำจาก 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำจากเขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ เขื่อนลำคาด Kong จังหวัดนครราชสีมา อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เรือนแก่งกระจาນ จังหวัดเพชรบุรี และสารน้ำเลี้ยงเป็ดหน้าเรือนจำคลองpermกรุงเทพฯ และยังได้สรุปว่าแหล่งน้ำภายในประเทศไทยนี้กำลังอยู่ในสภาพเสื่อมโทรมก่อให้เกิดอันตราย หากประชากรมีการบริโภคน้ำจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษนี้เป็นประจำ (อาการดันและคณะ 2542) นอกจากนี้การสำรวจของ วิเชียร และคณะ (2001) ยังพบว่า มีการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียนนี้ในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ ทั้งแหล่งน้ำที่ใช้เพื่อการเกษตร อุปโภค-บริโภค และเพื่อการพักผ่อน

จากปัญหานี้การปนเปื้อนของสารพิษนี้แนวทางหนึ่งที่จัดช่วยเหลือเพิ่มการใช้น้ำที่มีสารพิษปนเปื้อน คือการหาวิธีตรวจที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำในแหล่งน้ำต่างๆ ที่ผ่านมาการวิเคราะห์หาสารพิษกลุ่มนี้จะใช้เทคนิคทาง HPLC ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษหลัก (microcystin-LR, -RR และ -YR) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีความไวไม่เพียงพอในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีการปนเปื้อนระดับต่ำ อีกทั้งเครื่องมือมีราคาแพง และต้องใช้ผู้ตรวจวิเคราะห์ที่มีความชำนาญ จึงไม่

เหมาะที่จะนำมาใช้ในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษ ELISA เป็นเทคนิคนึงที่มีประสิทธิภาพสามารถตรวจหาสารพิษได้ครอบคลุมกว้างขวาง มีความไวสูง ไม่เจาะจงชนิดของในโครงซิสตินที่มีอยู่มากชนิด และยังสะดวกในการตรวจหาสารพิษจากตัวอย่างจำนวนมาก จึงเป็นข้อดีอย่างยิ่งในการช่วยตรวจหาสารพิษในระยบปฐมภูมิ ปัจจุบันบริษัทในต่างประเทศได้ผลิต ELISA KIT ขายในราคา KIT ละ 396 เหรียญдолลาร์สหรัฐ ซึ่งเป็นราคาที่ค่อนข้างสูงมากอีกทั้งน่ามีความจำเพาะต่อตัวอย่างในประเทศไทยอยู่ในเมริกา

โครงการวิจัยนี้จึงทำการผลิต ELISA Kit ดันแบบเพื่อใช้ตรวจหาสารพิษในโครงซิสตินในน้ำโดยการผลิตแอนติบอดี้รูมแบบ polyclonal antibody จากผลการทดลองชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษในน้ำได้ในระดับ 0.2 ppb (ต้องการเครื่องย่านค่า ELISA Reader) และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้สำคัญกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์กรอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb ซึ่งดันทุนในการผลิตชุดตรวจสอบนี้จะอยู่ที่ประมาณ 5,000 บาท (สำหรับการวิเคราะห์น้ำประมาณ 30 ตัวอย่าง) และมีคุณภาพในการตรวจวัดเท่าเทียมกัน อีกทั้งน้ำจะมีความจำเพาะกับสารพิษในไขยานโนเบดที่เรียกที่พนอยู่ในประเทศไทย โดยคาดว่าหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำเพื่อบริโภค เช่นการประปาฯ หลวง การประปาส่วนภูมิภาค ประปาหมู่บ้าน หรือหน่วยงานเป็นเจ้าของแหล่งน้ำเพื่อการอุปโภค เช่นการไฟฟ้าฝ่ายผลิต กรมชลประทาน และองค์กรบริหารส่วนตำบล จะเป็นผู้นำชุดตรวจสอบนี้ไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษนี้ในน้ำ อีกทั้งยังใช้เป็นระบบเดือนภัยสำหรับเกษตรกรที่ใช้น้ำนั้นให้หลีกเลี่ยงการใช้น้ำที่มีการปนเปื้อนของสารพิษในระดับอันตราย



ชุดตรวจสอบ ELISA kitสำหรับวิเคราะห์สารพิษในโครงซิสตินในน้ำ

กิจกรรมที่วางแผนและกิจกรรมที่ดำเนินงานมา

กิจกรรม	ปีที่ 1	
	1-6	7-12
1. ประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบในการตรวจวัดสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา 4 แห่งๆละ 4 จุด จำนวน 2 ชั้น รวม 32 ตัวอย่าง	↔↔	↔↔↔↔
2. เปรียบเทียบผลการตรวจสารพิษในน้ำประปาด้วยชุดตรวจสอบกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC รวม 32 ตัวอย่าง	↔↔↔↔	↔↔↔↔
3. ประเมินการใช้ชุดตรวจสอบในแหล่งน้ำธรรมชาติ ประมาณ 20 แห่ง	↔↔↔↔	↔↔↔↔
4. อิทธิพลของคุณภาพน้ำ เช่น pH ปริมาณคลอรีน เกลือ ชนิดต่างๆ ความขุ่น เป็นต้น ต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ	↔↔↔↔	↔↔↔↔
5. ศึกษาอายุการเก็บของชุดตรวจสอบ โดยเปรียบเทียบ วิธีการบรรจุแบบต่างๆ	↔↔↔↔	↔↔↔↔
6. การปรับปรุงให้ชุดตรวจสอบมีความกระทัดรัด เช่น ลด จำนวนขวดสารเคมี	↔↔↔↔	↔↔↔↔
7. การพัฒนาบรรจุภัณฑ์สำหรับชุดตรวจสอบ		↔↔↔↔
8. การผลิตชุดตรวจสอบจำนวน 200 ชุด	↔↔↔↔	
9. การประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจสอบในการใช้งาน	↔↔↔↔	↔↔↔↔
10. เมยแพร์และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการจัด สมมนาและสาธิตร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง		↔↔↔↔
11. สรุปและรายงาน		↔↔↔↔

↔↔↔↔ กิจกรรมที่วางแผน

↔↔↔↔ กิจกรรมที่ได้ดำเนินงาน

ผลที่คาดว่าจะได้รับเทียบกับผลที่ได้รับจริง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับจริง
1. ประเมินการใช้ชุดตรวจสอบในระบบการผลิตน้ำประปา	1. ชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ผลิตมีประสิทธิภาพสูง สามารถใช้งานได้จริงในระบบการผลิตน้ำ
2. เปรียบเทียบผลการตรวจสารพิษในน้ำประปាតด้วยชุดตรวจสอบกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC	2. ชุดตรวจสอบ ELISA kit มีประสิทธิภาพ ความแม่นยำใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งได้ยืนยันผลด้วย LC/MS แม้มีข้อดีกว่าในด้านความไว (sensitivity) เนื่องจากสามารถตรวจสารพิษจากตัวอย่างน้ำโดยตรง
3. ประเมินการใช้ชุดตรวจสอบสารพิษในแหล่งน้ำธรรมชาติ	3. มีความแม่นยำ และสามารถนำไปใช้งานในภาคสนาม
4. อิทธิพลของคุณภาพน้ำ เช่น pH คลอรีน เกลือ ความชุ่ม เป็นต้น ต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ	4. คุณภาพน้ำโดยทั่วไปไม่มีผลต่อประสิทธิภาพ และความแม่นยำของชุดตรวจสอบ ยกเว้นในกรณีที่ pH ต่ำกว่า 5.5 หรือสูงกว่า 7.5 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 100 mM หรือ 10 ppt ความเข้มข้นของเกลือและโซเดียมสูงกว่า 100 mM และความเข้มข้นของเหล็กในรูปออกซิไดซ์สูงกว่า 10 mM
5. ศึกษาอยุทธการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ	5. ชุดตรวจสอบควรเก็บในถุงพลาสติกภายในบรรยายกาศในตู้เย็นและเก็บรักษาในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส
6. การปรับปรุงให้ชุดตรวจสอบมีความคงที่ด้วย	6. เมื่อใช้น้ำยาในส่วนของ substrate ที่ผลิตทางการค้าแบบ 1 component ทำให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีขนาดเล็กลงเหมาะสมแก่การนำไปใช้ในภาคสนาม

เอกสารอ้างอิง

- วิเชียร ยงมานิตชัย, พกามาส อินทโชติ และ เดือนรัตน์ ชลอดุณกุล. 2001. การสำรวจความ
หลักหลาปใช้ยาโนเบคทีเรียพิษในประเทศไทย. 6th WRC Workshop on Eutrophication
and Toxic Cyanobacteria in Freshwater Reservoirs. 8-10 February 2001. Chiang Mai
University.
- อาจารย์ มหาขันธ์, ประไพกัตร คลังทรัพย์, พรรณรัตน์ รัตนโชค, วัลลภา อรุณไพรเจน, โภโมอาฐ
ชาโน, มาโกໂຕະ เอ็ม วادนาเบ, คุณมิทช์ คายา และพูนศุข อัตถะสัมปุณณะ. 2542. ความ
เป็นพิษของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในประเทศไทย วท.(14) 1 : หน้า 7-22.
- Al-Lay, J.K., G.K. Poon and G.A. Codd. 1988. Isolation and purification of peptide and
alkaloid toxins from *Anabaena flos-aquae* using high performance thin-layer
chromatography. *J. Microbiol. Methods.* 7 : 251-258.
- Anderson, R. J., H. A. Luu, D. Z. X. Chen, C. F. B. Holmes, M. L. Kent, L. Leblanc, F. J. R.
Taylor and D. E. Williams. 1993. Chemical and biological evidence links
microcystins to salmon "netpen liver disease". *Toxicon.* 31: 1315-1323.
- Anonymous. 2001. <http://www.envirologix.com/microcysintinstubekit.html>.
- Bourke, A. T. C., R. B. Hawes, A. Nielson and N. D. Stallman. 1983. An outbreak of
hepatointeritis (the Palm Island mystery disease) possible caused by algal
intoxication. *Toxicon. Suppl.* 3: 45-48.
- Botes, D.P., H. Kruger and C.C. Viljoen. 1982. Isolation and characterization of four toxins
from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon.* 20: 945-953.
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl.*
Bacteriol. 72: 445-459.
- Chorus, I. and J. Bartram. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public
Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, London. pp.415.
- Chu, F.S., X. Huang, R.D. Wei and W.W. Carmichael. 1989. Production and
characterization of antibodies against microcystins. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:
1928-1933.
- Chu, F.S., X. Huang and R.D. Wei. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for
microcystins in blue-green algal blooms. *J. Assoc. Off. Analys. Chem.* 73: 451-456.
- Delong, S. 1979. Drinking water and liver cell cancer : An epidemiological approach to the
etiology of this disease in China. *Chin. Med. J.* 92: 748-756.
- Dow, C.S., Swoboda, U.K. and Firth, P., 1994. Release and degradation of microcystin
during a *Microcystis aeruginosa* bloom in a freshwater reservoir. In, Detection

- Methods for Cyanobacterial toxins, eds., Codd, G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W. and Potter, E., pp. 158-160. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Falconer, I.R., J.V. Smith, A.R.B. Jackson, A. Jones and M.T.C. Runnegar. 1988. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. *J. Toxicol. Environ. Health.* 24: 291-298.
- Falconer, I. R., M. D. Burch, D. A. Steffensen, M. Choice and O. R Coverdale. 1994. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ. Toxicon. Water Qual.* 9: 131-139.
- Fitzgeorge, R. B., S. A. Clack and C. W. Keevil. 1994. Routes of intoxication, pp. 69-74. In, Detection Methods for Cyanobacteria Toxins, G. A. Codd and T. M. Jefferies (eds.). The Royal Society of Chemistry. Bath University Press, Cambridge.
- Harada, K.I., K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A. Dahlem, V.R. Beasley and W.W. Carmichael. 1988. Chemical analysis of toxic peptides produced by cyanobacteria. *J. Chromatogr.* 448: 275-283.
- Harada, K.I., K. Ogawa, K. Matsuura, H. Nagai, H. Murata, M. Suzuki, Y. Itezono, N. Nakayama, M. Shirai and M. Nakano. 1991. Isolation of two toxic hepatopeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon.* 29: 479-489.
- Kfir, R., E. Johannsen and D.P. Botes. 1986. Monoclonal antibody specific cyanoginosin-LA preparation and characterization. *Toxicon.* 24: 543-552.
- Krishnamurthy, T., W.W. Carmichael, and E.W. Sarver. 1986. Investigations of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxic peptides. I. Isolation, purification, and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon.* 24: 865-873.
- Kungswan, A., T. Noguchi, M. F. Watanabe, S. Matsunaga, S. Watanabe and K. Hashimoto. 1987. Isolation of two toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 2051-2560.
- Kungswan, A., K. Noguchi, S. Matsunaga, M.F. Watanabe, S. Watabe and K. Hashimoto. 1988. Properties of two toxins isolated from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon.* 26: 119-125.
- Tanaka, Y., S. Takenaka, H. Matsuo, S. Kitamori and H. Tokiwa. 1993. Levels of microcystins in Japanese lakes. *Toxicol. Environ. Chem.* 39: 21-28.

- Theiss, W.C., W.W. Carmichael, J. Wyman and R. Bruner. 1988. Blood pressure and hepato-cellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. *Toxicon*. 26: 603-613.
- Tsuji, K., S. Naito, F. Kondo, N. Ishikawa, M.F. Watanabe, M. Suzuki and K.L. Harada. 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.* 28: 173-177.
- Wright, B. W., G. A. Ross and R. D. Smith. 1989. Capillary zone electrophoresis with laser fluorescence detection of marine toxins. *J. Micro-column Separations*. 1: 85-92.
- Yu, S. Z. 1989. Drinking water and primary liver cancer. In, Primary Liver Cancer, Z. Y. Tang, M. C. Wu and S. S. Xia (eds.). China Academic Publishers, Bei Jing, Springer-Verlag, Berlin.