



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินความสามารถในการดูดซึมของสังกะสี แคดเมียม และตะกั่วในดิน:
การตรวจสอบโดยใช้วิธีการแลกเปลี่ยนประจุบวก
และการวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิด

โดย

ทินกร เตียนสิงห์

เมษายน 2554

สัญญาเลขที่ MRG4780030

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินความสามารถในการดูดซึมของสังกะสี แคดเมียม และตะกั่วในดิน:
การตรวจสอบโดยใช้วิธีการแลกเปลี่ยนประจุบวก
และการวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิด

ผู้วิจัย

ดร. ทินกร เตียนสิงห์

สังกัดภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: **MRG4780030**

ชื่อโครงการ: การประเมินความสามารถในการดูดซึมของสังกะสี แคดเมียม และตะกั่วในดิน:

การตรวจสอบโดยใช้วิธีการแลกเปลี่ยนประจุบวก และการวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิด

ชื่อนักวิจัย ดร. ทินกร เตียนสิงห์

สถาบัน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย

E-mail Address: scotts@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2547 ถึง 30 มิถุนายน 2549

มลภาวะของโลหะหนักขึ้นอยู่กับปริมาณทั้งหมดและรูปฟอร์มที่มีอยู่ในดิน ไอออนอิสระของโลหะสามารถละลายได้ดีในน้ำในดินและส่งผลกระทบต่อระบบสิ่งมีชีวิต ผลกระทบนี้อาจจะนิยามเป็นค่าดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ โดยมีอิทธิพลขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของการแพร่กระจายรูปฟอร์มโลหะและสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้เพื่อหาปริมาณของโลหะหนักสังกะสี (Zn) แคดเมียม (Cd) และตะกั่ว (Pb) ในดิน โดยการวิเคราะห์หาปริมาณทั้งหมดและรูปฟอร์มประจุสองบวกของ Zn^{2+} , Cd^{2+} และ Pb^{2+} และวิเคราะห์หากรดไขมันฟอสโฟไลปิดที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดิน ด้วยการแยกรูปฟอร์มของ Zn^{2+} , Cd^{2+} และ Pb^{2+} ใช้เทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุบวกด้วยเรซิน amberlite IR120 ในสถานะสมดุลของสารละลาย ผลของการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของปริมาณโลหะทั้งหมดกับโลหะประจุสองบวกมีลักษณะเป็นเส้นตรง ซึ่งเป็นไปตามค่าไอโซเทอร์มของการดูดซับ ค่าประสิทธิภาพของการดูดซับของโลหะประจุสองบวกบนเรซินที่ศึกษามีค่ามากกว่า 95%

ส่วนการวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิดใช้เทคนิคทางแก๊สโครมาโทกราฟีโดยมีเครื่องตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน ใช้คอลัมน์เฮกซ์-5 โดยทำการเปลี่ยนกรดไขมันอิสระที่สกัดได้จากพีแอลเอฟเอให้เป็นอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ และทำการเปรียบเทียบผลกับกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ของสารมาตรฐาน ได้แก่ กรดลอริก, กรดไมริสติก, กรดสเตียริก, กรดปาล์มิติก, และกรดอะราซิดิก ระบบการวิเคราะห์ด้วยจีซีได้ความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.1-100 พีพีเอ็ม มีค่าความเส้นตรงมากกว่า 0.9000 มีขีดจำกัดของการวิเคราะห์ต่ำสุดอยู่ในช่วง 0.06-0.17 พีพีเอ็ม ผลการวิเคราะห์รูปแบบของพีแอลเอฟเอของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและไม่ใช้กลุ่มโคลิฟอร์ม พบว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกับสารมาตรฐานแฟมที่ทำการศึกษา ข้อมูลความสัมพันธ์หารูปฟอร์มโลหะและกรดไขมันฟอสโฟไลปิด เป็นมูลของตัวดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกัน ซึ่งสามารถสร้างรูปแบบจำลองที่ใช้ในการทำนายผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นได้ในสิ่งแวดล้อม

คำหลัก: Metal speciation, Phospholipid fatty acids (PLFAs), Fatty acid methyl esters (FAMES), Gas chromatography (GC)

Abstract

Project code: MRG4780030

Project title: Evaluation of adsorption efficiency of zinc, cadmium and lead in soil: Investigation by using cation-exchange method and the analysis of phospholipids fatty acids

Researcher Dr. Tinnakorn Tiensing

Institute Chemistry Department, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address: sctts@mahidol.ac.th

Project period: 1 July 2547 - 30 June 2549

Metal pollution depends on total metal loaded and metal species in the soils. Free metal ions are well dissolved in soil pore water and directly affect to organisms. This effect can be defined as bioindicator which is influenced with the relationship between metal species and the organism. This study was to determine heavy metal of zinc (Zn), cadmium (Cd) and lead (Pb) in soil by measuring divalent cations forms of Zn^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} . Furthermore, the analysis of phospholipids fatty acids (PLFAs) found in cell membrane of microorganisms was also investigated. Metal forms of Zn^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} were measuring by cation-exchange technique using AmberliteIR120 in equilibrium solution. Observed results showed linear relationship between total metal content and divalent metals that correlated to adsorption isotherm. Efficiency of the adsorption of divalent metals on the studied resin was more than 95%.

The analysis of phospholipids fatty acids was used gas chromatography equipped with flame ionization detector and HP-5 column. PLFAs were derivatized by converting free fatty acids into derivatives of methyl esters of fatty acids and then compared the results with standard fatty acid methyl esters of loric, myristic, stearic, palmitic and arachidic. Optimized condition of GC showed the linear range of 0.1 – 100 ppm with linearity greater than 0.9000. Limit of detect values were in the range of 0.06 – 0.17 ppm. The PLFAs profiles of coliform and non-coliform were similar to the profile studied of standard FAMES. Information of both metal forms and PLFAs has significantly correlation of both bioindicators which can be simulated for the future prediction of ongoing situation in the environment.

Keywords: Metal speciation, Phospholipid fatty acids (PLFAs), Fatty acid methyl esters (FAMES), Gas chromatography (GC)

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จากปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน การศึกษาเพื่อหาสาเหตุและแนวทางการจัดการกับปัญหานั้นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้ศึกษาถึงมลภาวะของโลหะสังกะสี (Zn) แคดเมียม (Cd) และตะกั่ว (Pb) ในดิน โดยทำการแยกรูปฟอร์มของโลหะที่เป็นไอออนอิสระซึ่งจัดเป็นรูปที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้มากที่สุด เพราะการวิเคราะห์โดยทั่วไปวัดเป็นค่าปริมาณทั้งหมด ซึ่งจะไม่สอดคล้องกับผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง การศึกษานี้จะทำการแยกรูปฟอร์มของโลหะสองบวกในสถานะสมดุลด้วยเทคนิคการแยกด้วยเรซินแบบประจุบวก และวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของกรดไขมันฟอสโฟไลปิดที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ประกอบด้วย โดยทั้งสองตัวแปรที่ศึกษาอาจจะนิยามเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (bioindicator) ที่สำคัญที่สามารถศึกษาได้ด้วยวิธีการทางเคมี

ดินเป็นแหล่งที่สามารถกักตุนมลพิษทางธรรมชาติได้ สามารถเก็บหรือควบคุมการแพร่กระจายของมลพิษได้ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งที่มลพิษสามารถเข้าสู่สิ่งมีชีวิตได้โดยผ่านทางพืชซึ่งเป็นแหล่งอาหารหลักและอาจจะก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพของมนุษย์ตามมาได้ โลหะหนักในดินจะมีอยู่ในปริมาณที่มากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพของดิน การใช้งานของดิน และองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในดิน รูปฟอร์มของโลหะหนักที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิต เป็นรูปฟอร์มที่เคลื่อนที่ได้อิสระหรือละลายได้ดีในน้ำในดิน เมื่อเกิดผลกระทบต่อระบบของสิ่งมีชีวิตในดิน ก็สามารถเห็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันฟอสโฟไลปิดได้เช่นกัน โดยความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่กระจายของรูปฟอร์มโลหะและผลกระทบต่อระบบของสิ่งมีชีวิตนี้ เป็นค่าความเป็นพิษ

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์อย่างง่ายและเชื่อถือได้สำหรับรูปฟอร์มของโลหะสังกะสี แคดเมียม และตะกั่วในดิน รวมทั้งวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิดที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดิน พัฒนาการสกัดน้ำในดินสำหรับการวิเคราะห์โดยไม่มีการทำลายตัวอย่างดิน และเป็นการรวบรวมแปลผลข้อมูลทางด้านเคมีของโลหะและผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดิน ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นประโยชน์ต่อการประเมินคุณภาพของดิน รวมถึงการใช้งานของดินด้วย

3. วิธีวิจัย

3.1 การแยกรูปฟอร์มของโลหะ Zn, Cd และ Pb โดยใช้ Cation-Exchange Resin

3.2 การวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

4. สรุปผลการทดลอง

การทดลองแบ่งได้ 2 ส่วนสำคัญคือ ส่วนการศึกษารูปฟอร์มของโลหะหนักในสารละลายด้วยเทคนิคการแยกโลหะอิสระประจุสองบวกด้วย Cation-exchange resin แบบ Amberlite IR120 และการวิเคราะห์ Phospholipid fatty acids (PLFAs) ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโลหะ Zn, Cd และ Pb ที่มีอยู่ในสารละลายเป็นค่าที่วิเคราะห์ได้โดยตรงด้วยเทคนิคทาง flame atomic spectroscopy บอกถึงปริมาณทั้งหมดของโลหะ ส่วนรูปฟอร์มของโลหะประจุสองบวกนั้น (Zn^{2+} , Cd^{2+} , และ Pb^{2+}) บอกถึงการกระจายตัวของโลหะประจุสองบวกซึ่งเป็นรูปที่มีผลกระทบต่อระบบสิ่งมีชีวิตได้มากที่สุด การหารูปฟอร์มนี้ใช้เทคนิคของการแยกประจุด้วยการใช้เรซินจับกับโลหะประจุสองบวกในสถานะสมดุลในสารละลาย แล้วคำนวณหาปริมาณจากค่าความจุของเรซินเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่ในสารละลายก่อนและหลังการเกิดสมดุลกับเรซิน ความสัมพันธ์ของโลหะทั้งสามระหว่างปริมาณทั้งหมดกับโลหะประจุสองบวกจะมีความเป็นตรง โดยมีค่าความสัมพันธ์ (R^2) ของ Zn/ Zn^{2+} มีค่า 96.43%, Cd/ Cd^{2+} มีค่า 98.46% และ Pb/ Pb^{2+} มีค่า 99.99% ตามลำดับ

การศึกษารูปแบบของ PLFAs ทำได้โดยการเตรียมอนุพันธ์ fatty acid methyl ester (FAME) จากกรดไขมันโดยใช้สารละลายกรดในเมทานอล โดยกรดจะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กรดที่ใช้ศึกษาพบว่า HCl ใช้ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) และ กรด H_2SO_4 ที่ความเข้มข้น 5% (v/v) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ BF_3 ได้ด้วยเช่นกัน ตัวแปรที่ควบคุมการเกิดปฏิกิริยา methylation ของเมทานอล ได้แก่ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในเกิดปฏิกิริยา คือ 50 – 60 °C และใช้เวลา 10 นาทีในการทำปฏิกิริยา สารอนุพันธ์ของ FAMES ที่ได้สามารถวิเคราะห์ได้ดีด้วยเครื่อง GC-FID ให้ผลของการวิเคราะห์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้จากการประเมินความสามารถของเครื่องมือที่ใช้ นอกจากนี้การศึกษารูปแบบ phospholipids fatty acids จากสารมาตรฐานซึ่งใช้เป็นตัวแทนกลุ่มสาร PLFAs จากธรรมชาติ สามารถใช้เทคนิคของการเตรียมตัวอย่างแบบ solid phase extraction (SPE) โดยเก็บส่วนที่ชะ PLFA ได้ด้วยเมทานอล แล้วทำการแยกกรดไขมันอิสระออกจาก phospholipids ด้วยเทคนิค saponification แล้วทำการเตรียมอนุพันธ์ของ FAMES แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID รูปแบบของโครมาโทแกรมของ FAME ที่ได้จะมีลักษณะที่เป็นรูปแบบเฉพาะตามกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ศึกษา โดยตำแหน่งของกรดไขมันเอสเทอร์ที่แตกต่างกันปรากฏขึ้น ณ เวลาที่แตกต่างกัน และจำนวนของ FAME ก็สอดคล้องกับกลุ่มของจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ii
Abstract (English)	iii
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	iv
 บทที่ 1 บทนำ	 1
1. วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
 บทที่ 2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุ	 2
1. บทนำ	2
2. วัตถุประสงค์	3
3. การทดลอง	3
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	3
3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้	3
3.2 วิธีการทดลอง	3
4. ผลการทดลอง	4
5. สรุปผลการทดลอง	7
6. เอกสารอ้างอิง	7
 บทที่ 3 การวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิด	 8
1. บทนำ	8
2. วัตถุประสงค์	10
3. การทดลอง	10
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	10
3.2 สารเคมีและวัสดุ	11
3.3 วิธีการทดลอง	12
3.3.1 Derivatization method with acids in methanol	12
3.3.2 Derivatization method with 14% (v/v) boron trifluoride In methanol	13
3.3.3 Saponification	13
3.3.4 Solid phase extraction for lipid fractionation	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4. ผลการทดลอง	16
4.1 วิธีการเตรียม FAMES	16
4.1.1 การเตรียม FAMES ด้วย HCl/methanol	16
4.1.2 การเตรียม FAMES ด้วย H ₂ SO ₄ /methanol	17
4.1.3 การเปรียบเทียบการเตรียม FAMES ด้วย HCl และ H ₂ SO ₄	17
4.1.4 ผลของอุณหภูมิต่อการเตรียม FAMES	18
4.1.5 ผลของเวลาต่อการเตรียม FAMES	19
4.1.6 การเตรียม FAMES ด้วย 14% BF ₃ /methanol	20
4.2 Analytical performance	22
4.3 การวิเคราะห์ PLFAs	24
4.3.1 Saponification method	24
4.3.2 Solid phase extraction for lipid fractionation	25
4.4 รูปแบบของ PLFAs	28
5. สรุปผลการทดลอง	30
6. เอกสารอ้างอิง	30

สารบัญตาราง

	หน้า
บทที่ 3 การวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิด	
Table 1.1 ตัวอย่างตัวชี้วัดของกรดไขมันที่ใช้จัดกลุ่มของจุลินทรีย์ (Vestal and White, 1989)	8
Table 1.2 ประเภทของ PLFAs	9
Table 3.1 สภาวะของเครื่อง GC-FID	11
Table 3.2 รายการสารเคมีและวัสดุที่ใช้	11
Table 4.2.1 Analytical performance ของเครื่อง GC-FID จากการวิเคราะห์ FAMES ที่เตรียมจาก 5% (v/v) H ₂ SO ₄ ในเมทานอล	23
Table 4.2.2 Analytical performance ของเครื่อง GC-FID จากการวิเคราะห์ FAMES ที่เตรียมจาก 14% (v/v) BF ₃ ในเมทานอล	23
Table 4.3.1 Percent recovery of packing materials for PLFA of myristic, palmitic and stearic acid by converting to FAMES.	26
ตาราง 4.3.2 Percent recovery of elution volume of methanol using SPE-silica 0.3 g for eluting PLFA of myristic, palmitic and stearic acid converted to FAMES.	27

สารบัญภาพ

	หน้า
บทที่ 2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุ	
Figure 4.1 Correlation between total metal concentrations and metal species (Zn/Zn^{2+} , Cd/Cd^{2+} and Pb/Pb^{2+}) comparing between experimental (thin line) and calculation (thick line).	5
Figure 4.2 Relationship between total metal content and divalent metals obtained from the solution containing 3% of carbonate solution.	6
Figure 4.3 Relationship between total metal content and divalent metals obtained from aqueous solution.	6
บทที่ 3 การวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิด	
Figure 1.1 โครงสร้างของ PLFA	9
Figure 4.1.1 Effects of HCl concentration in methanol on peak area for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and arachidic acid (C20:0).	16
Figure 4.1.2 Effects of H_2SO_4 concentration in methanol on peak area for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and arachidic acid (C20:0).	17
Figure 4.1.3 Comparison of peak area between 5% H_2SO_4 and 1% HCl concentration for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and arachidic acid (C20:0).	18
Figure 4.1.4 Effects of reaction temperature of 5% H_2SO_4 in methanol for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and arachidic acid (C20:0).	19
Figure 4.1.5 Effects of reaction time of 5% H_2SO_4 in methanol for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and arachidic acid (C20:0).	20
Figure 4.1.6 Effects of reaction temperature of 14% BF_3 in methanol for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and arachidic acid (C20:0).	21
Figure 4.1.7 Effects of reaction time of 14% BF_3 in methanol for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and arachidic acid (C20:0).	21

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
Figure 4.2.1 Chromatogram of FAMES using 5%(v/v) H ₂ SO ₄ in methanol as derivatizing agent: methyl laurate (MeC12:0), methyl myristate (MeC14:0), methyl palmitate (MeC16:0), methyl heptadecanoate (MeC17:0), methyl stearate (MeC18:0) and methyl arachidate acid (MeC20:0).	22
Figure 4.2.2 Chromatogram of FAMES using 14%(v/v) BF ₃ in methanol as derivatizing agent: methyl laurate (MeC12:0), methyl myristate (MeC14:0), methyl palmitate (MeC16:0), methyl heptadecanoate (MeC17:0), methyl stearate (MeC18:0) and methyl arachidate acid (MeC20:0).	22
Figure 4.3.1 Effects of reaction temperature on peak area for saponified PLFAs of myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0).	24
Figure 4.3.2 Effects of reaction time on peak area for saponified PLFAs of myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0).	25
Figure 4.4.1 PLFAs profile of dark-colony (coliform bacteria).	29
Figure 4.4.2 PLFAs profile of white-colony (non-coliform bacteria).	29

บทที่ 1

บทนำ

ผลกระทบของโลหะหนักสังกะสี (Zn) แคดเมียม (Cd) และตะกั่ว (Pb) ที่มีต่อสภาพแวดล้อมในดิน สามารถประเมินได้โดยการวัดปริมาณโลหะทั้งหมด ค่าที่ได้จะไม่สอดคล้องกับผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง เพราะจะมีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สามารถเข้าสู่ระบบของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งค่าตัวแปรนี้จะเรียกว่าดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (bioindicator) ดังนั้นการศึกษาเพื่อหารูปฟอร์มของโลหะที่สัมพันธ์กับปริมาณของโลหะทั้งหมดจึงมีความสำคัญเพื่อไขข้อสงสัยถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง วิธีการหารูปฟอร์มของโลหะสามารถหาได้ด้วยเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุบวก รูปฟอร์มของโลหะในระบบต่างๆ จะสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อมที่โลหะมีการกระจายตัว และขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพที่สำคัญของดิน ค่าดัชนีชี้วัดทางชีวภาพเป็นดัชนีที่มีความสำคัญในการศึกษาทางด้านเคมีและสิ่งแวดล้อม เพราะเป็นค่าที่บอกถึงผลกระทบของสารเคมีที่ศึกษาต่อระบบของสารเคมีในสิ่งมีชีวิต การเลือกวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดไขมันฟอสโฟไลปิดประกอบด้วยองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ในดิน โดยองค์ประกอบของกรดไขมันฟอสโฟไลปิดนี้ เป็นค่าดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่สามารถวัดได้จากระบบของสิ่งมีชีวิต และยังเป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบปริมาณและรูปฟอร์มของโลหะหนัก Zn, Cd และ Pb ต่อปริมาณของกรดไขมันอีกด้วย โดยจะมีความสัมพันธ์ที่สามารถบอกถึงระดับความเสี่ยงและการปนเปื้อนในดินได้

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.1 เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์อย่างง่ายและเชื่อถือได้สำหรับรูปฟอร์มของโลหะหนัก รวมถึงกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดิน
- 1.2 เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดน้ำในดินสำหรับการวิเคราะห์รูปฟอร์มของโลหะโดยไม่มีการทำลายตัวอย่าง
- 1.3 เพื่อเป็นการรวบรวมและแปลผลข้อมูลทางด้านเคมีของรูปฟอร์มโลหะและผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดิน ซึ่งคาดว่าจะประโยชน์ต่อการประเมินคุณภาพของดิน รวมถึงการใช้งานของดิน

บทที่ 2

การตรวจสอบโดยใช้วิธีการแลกเปลี่ยนประจุบวก

1. บทนำ

การวิเคราะห์รูปฟอร์มของโลหะ Zn, Cd และ Pb บวกถึงรูปฟอร์มที่เคลื่อนที่ได้อิสระในรูปของประจุบวก ได้แก่ Zn^{2+} , Cd^{2+} และ Pb^{2+} ซึ่งสามารถละลายได้ดีกับน้ำในดิน (Soil Pore Water) นอกจากนี้ยังมีรูปฟอร์มอื่นๆ ได้แก่ สารเชิงซ้อนกับน้ำ สารเชิงซ้อนกับประจุลบ เช่น Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , OH^- เป็นต้น และเกิดเป็นสารเชิงซ้อนกับสารอินทรีย์ของคาร์บอนในรูปต่างๆ ที่ส่งผลต่อการกระจายตัวของรูปฟอร์มโลหะ เช่น กรดฮิวมิก สารละลายอินทรีย์ (Dissolve organic carbon) หรือค่าปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (Total Carbon) ทั้งในส่วนที่เป็นคาร์บอนอินทรีย์และคาร์บอนอนินทรีย์ ที่ส่งผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่กระจายของรูปฟอร์มโลหะได้หลายแบบ ปริมาณของ DOC และประจุลบอื่น ซึ่งในส่วนนี้สามารถแสดงผลได้ในรูปของกราฟ species distribution โดยสามารถคำนวณได้จากค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์ต่างๆ และมีโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณต่างๆ เช่น WINTEQ, WINHumicV เป็นต้น โดยผลการทดลองที่ได้สามารถที่จะใช้เปรียบเทียบกับผลการคำนวณทางโปรแกรมการแยกรูปฟอร์มของโลหะประกอบด้วย

การศึกษาได้ทำการหาความสัมพันธ์ของปริมาณโลหะทั้งหมดต่อปริมาณของโลหะประจุสองบวก โดยใช้เรซิน AmberliteIR120 ในการแยก ในระบบที่เป็นแบบ Batch โดยทำให้สารละลายโลหะอยู่ในสมดุลกับเรซิน แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะที่เหลืออยู่ในสารละลาย เทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น ในการคำนวณหาความเข้มข้นของโลหะประจุสองบวกคำนวณได้โดยตรง จากสมการที่ (1) ของการหาความเข้มข้นของ Zn^{2+} , Cd^{2+} และ Pb^{2+} ดังแสดงนี้

$$[M^{2+}]_s = [M_T] \times ([M_T] - [M_S]) \times M_S^{-1} \times ([M_T]^* - [M_S]^*)^{-1} \times M_S^* \quad (1)$$

โดย $[M^{2+}]_s$ คือ ความเข้มข้นของโลหะประจุสองบวกที่คำนวณได้

$[M_T]$ คือ ความเข้มข้นของโลหะทั้งหมดในสารละลาย

$[M_S]$ คือ ความเข้มข้นของโลหะหลังผ่านเรซิน

$[M_T]^*$ คือ ความเข้มข้นของโลหะทั้งหมดที่เป็นสารละลายมาตรฐาน

$[M_T]^*$ คือ ความเข้มข้นโลหะทั้งหมดหลังผ่านเรซินที่เป็นสารละลายมาตรฐาน

กรณีที่สารละลายเป็นสารละลายมาตรฐานโดยการเทียบผลต่างระหว่างความเข้มข้นทั้งหมดกับความเข้มข้นที่เหลืออยู่ในสารละลายหลังจากอยู่ในสมดุลกับเรซิน ซึ่งปริมาณของโลหะที่จับอยู่กับเรซินจะเป็นโลหะที่มีประจุสองบวก อีกวิธีที่ใช้หาความเข้มข้นของโลหะสองบวก คือ การคำนวณโดยการเปรียบเทียบระหว่างสารละลายมาตรฐานกับสารละลายตัวอย่างจากน้ำสกัดดิน หรือเป็นสารละลายที่มี chelate ประเภทต่างๆ ที่เกิดสารเชิงซ้อนได้อยู่ด้วย

จากผลของรูปฟอร์มโลหะ Zn, Cd และ Pb ในรูปของโลหะสองบวกที่มีอยู่ละลายอยู่ในน้ำในดิน ที่สกัดคาดว่าจะมีความสัมพันธ์กันอย่างเป็นเส้นตรง อันเนื่องมาจากความเป็นพิษของโลหะต่อระบบ

สิ่งมีชีวิต ซึ่งค่าของฟอสโฟไลปิดจะแสดงในเชิงตรงกันข้ามกับความเข้มข้นของโลหะที่พบ ดังนั้นความสัมพันธ์ที่ได้จะสามารถใช้อบกระดั้ความเสี่ยงในเบื้องต้นได้ การที่จะบอกความเสี่ยงในระดับที่สูงขึ้นหรือครอบคลุมมากขึ้น ต้องใช้ดัชนีทางชีวภาพอื่น ๆ ร่วมด้วย

2. วัตถุประสงค์

- (1) พัฒนาวีธีการวิเคราะห์รูปฟอร์มของโลหะสังกะสี แคดเมียม และตะกั่ว ด้วยเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุ
- (2) พัฒนาวีธีการสกัดน้ำในดิน สำหรับการวิเคราะห์รูปฟอร์มของโลหะ

3. การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโลหะ Zn, Cd และ Pb ใช้ flame atomic absorption spectrometry (FAAS)

3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้

วัสดุสารเคมีที่สำคัญในการทดลองนี้ ได้แก่ เรซิน (Amberlite IR120) เกลือในเตรทของ Zn, Cd และ Pb, calcium acetate, calcium nitrate, nitric acid เป็นต้น

3.3 วิถีการทดลอง - Speciation of metals

- (1) Amberlite IR120 (strong acidic cation exchange resin – sulfonic acid functionally) รูป Na/H-form ต้องทำการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ Ca-form ก่อนใช้งาน
- (2) การเปลี่ยนรูปของเรซินจาก Na-form เป็น Ca-form
 - ล้างเรซินด้วยกรด HNO_3 0.1 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการใช้งาน หรือเปลี่ยนรูปฟอร์ม (สามารถนำไปใช้งานได้ตามลักษณะการแยก)
 - การเปลี่ยนรูปฟอร์มของเรซินทำโดยผ่านสารละลายต่างๆ ดังนี้ คือ 1000 ml of 1 M $\text{Ca}(\text{Ac})_2$, 0.01 M $\text{Ca}(\text{Ac})_2$, และ 0.01 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ตามลำดับ
- (3) การทดลอง
 - ชั่งเรซินมาประมาณ 100 mg ใส่ลงในขวดรูปชมพู่
 - เติมสารละลายของ Zn, Cd และ Pb ลงไป 10.0 ml โดยทำการศึกษาเฉพาะโลหะเดี่ยวๆ ก่อน ตามความเข้มข้นในช่วง 0-10 ppm สำหรับ Zn, 0-1500 ppb สำหรับ Cd, และ 0-3 ppm สำหรับ Pb ตามลำดับ
 - ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- นำเฉพาะส่วนสารละลายในไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะที่เหลืออยู่
- ทำการเปรียบเทียบกับปริมาณของสารละลายโลหะที่ไม่ได้เติมเรซิน
- คำนวณหาปริมาณ Zn^{2+} , Cd^{2+} และ Pb^{2+} จากสมการ (1)

ขั้นตอนนี้จะศึกษาโดยใช้น้ำเป็นตัวสกัดที่สำคัญ เพราะต้องการให้ระบบที่ศึกษาเหมือนอยู่ในสภาวะจริงตามที่มีน้ำในดินอยู่ และป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ต้องการสกัดตาย

4. ผลการทดลอง

Speciation of metals

ผลของการแยกรูปฟอร์มของ Zn^{2+} , Cd^{2+} , และ Pb^{2+} ต่อปริมาณความเข้มข้นของโลหะทั้งหมดด้วยเทคนิคการแยกด้วย AmberliteIR120 จากการดูดซับไอออนของโลหะด้วยเรซิน AmberliteIR120 ซึ่งเป็น strong acid sulfonic group การเปลี่ยนรูปจาก Na-form ให้กลายเป็น Ca-form ด้วยสารละลาย calcium acetate และ calcium nitrate เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนประจุสองบวกของโลหะ ถึงแม้จะไม่มี การเปลี่ยนรูปผลของการดูดซับก็สามารถคำนวณได้จากค่า capacity factor การเปลี่ยนรูปฟอร์มของเรซิน เพื่อให้มีความเหมาะสมกับลักษณะของประจุที่จะมีการแลกเปลี่ยนกันในสารละลาย โดยสามารถวิเคราะห์หาปริมาณของ Ca ที่หลุดออกมาได้ ซึ่งก็มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยกับปริมาณของโลหะประจุสองบวกที่เกาะกับเรซิน ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1 เป็นรูปที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโลหะแต่ละชนิดกับปริมาณของโลหะประจุสองบวกที่ทำการคำนวณโดยการเทียบส่วนต่างกับการใช้สมการดังข้างต้นให้ผลสอดคล้องกัน โดยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงของการศึกษา

เทคนิคการศึกษาด้วยเรซินนี้พัฒนาจากวิธีการทดลองของ Homle et al (1995) โดยอาศัยหลักการของสมดุล โดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นของโลหะในสารละลายระหว่างประจุสองบวกที่อยู่ในสารละลายและโลหะที่เกาะกับเรซิน โดยทั่วไปไอออนในรูปอิสระจะพบว่ามีความเป็นพิษมากกว่าโลหะ วิธีการแยกรูปฟอร์มนั้นขึ้นอยู่กับเทคนิคที่นำมาใช้ เพราะโลหะอาจจะมีหลายรูปฟอร์มในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันไป ไอออนอิสระของ Zn^{2+} , Cd^{2+} , และ Pb^{2+} จะได้รับผลกระทบโดยตรงจากค่า pH ของสารละลาย โดยไอออนในรูป Zn^{2+} , Cd^{2+} , และ Pb^{2+} พบได้ถ้า pH มีค่าน้อยกว่า 6 ถ้าค่า pH ของสารละลายสูงขึ้น ($pH > 7.6$) อาจพบว่าโลหะในรูปฟอร์มของไฮดรอกไซด์ได้ (van Leeuwen, 1999; McGrath et al., 1999)

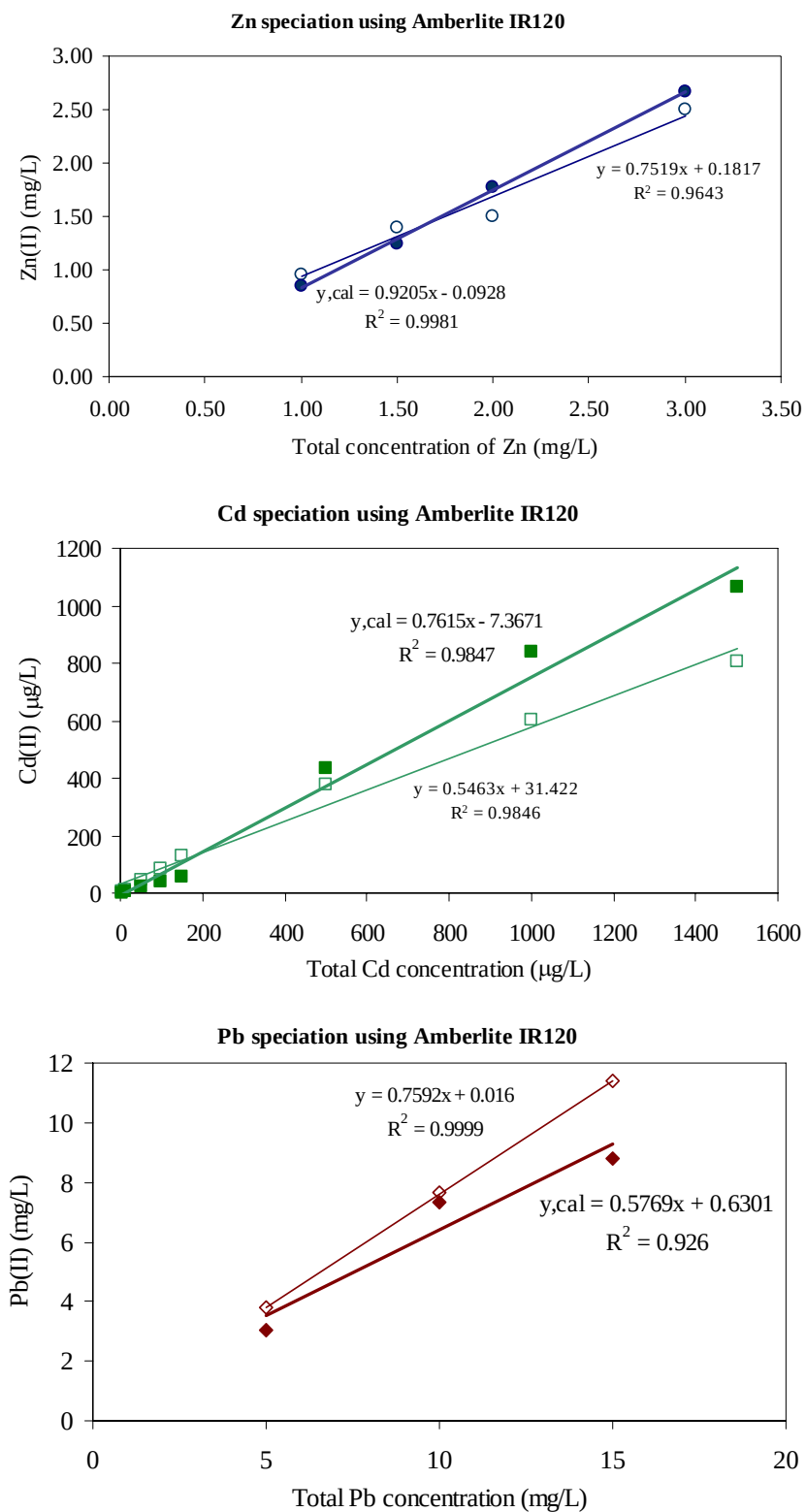


Figure 4.1 Correlation between total metal concentrations and metal species (Zn/Zn^{2+} , Cd/Cd^{2+} and Pb/Pb^{2+}) comparing between experimental (light line) and calculation (thick line).

สำหรับรูปที่ 4.2 และ 4.3 เป็นรูปที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโลหะแต่ละชนิดกับปริมาณของโลหะประจุสองบวก โดยนำมาเขียนอยู่ในกราฟเดียวเพื่อการเปรียบเทียบ

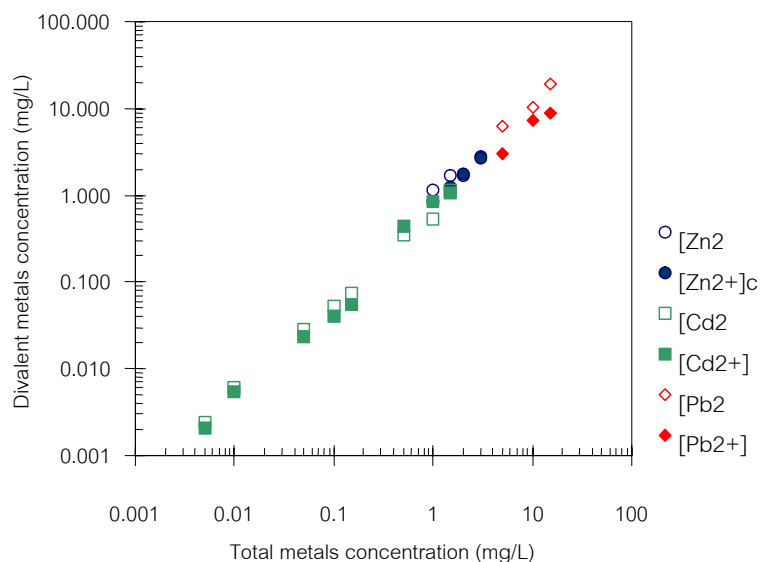


Figure 4.2 Relationship between total metal content and divalent metals obtained from the solution containing 3% of carbonate solution.

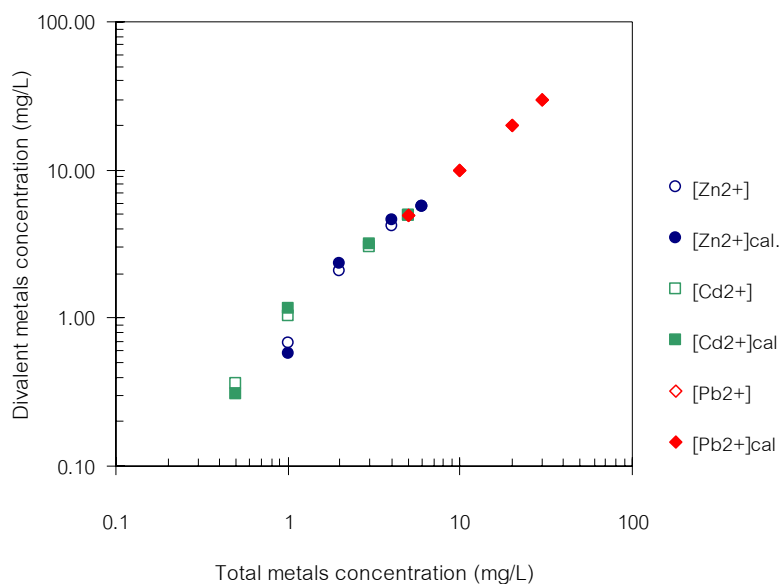


Figure 4.3 Relationship between total metal content and divalent metals obtained from aqueous solution.

ผลการทดลองได้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง สมการเส้นตรงนี้จะใช้ในการคำนวณเพื่อหา Adsorption isotherm ลักษณะของการดูดซับของเรซินก็เป็นแบบจำลองหนึ่งที่น่าไปใช้ในการจำแนกสถานะที่มีไอออนอื่นๆ ที่สามารถแย่งเกาะกับเนื้อดินได้ และการหารูปฟอร์มของโลหะในดินที่ปนเปื้อนก็จะต้องพิจารณาปัจจัยอื่นประกอบด้วย โดยเฉพาะไอออนอื่นๆ ที่มีอยู่ในสารละลาย ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดและปริมาณของไอออนที่มีอยู่ในสารละลาย สามารถนำสมการการคำนวณทางด้าน metal speciation มาใช้ร่วมเพื่อการทำนายผลที่เกิดขึ้นได้ โดยสมการนั้นมีการนำค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์ของปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับไอออนต่างๆ ในสารละลายมาคิดรวมด้วย ทำให้ผลการคำนวณที่ได้มีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

5. สรุปผลการทดลอง

จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโลหะ Zn, Cd และ Pb ที่มีอยู่ในสารละลายเป็นค่าที่วิเคราะห์ได้โดยตรงด้วยเทคนิคทาง flame atomic spectroscopy บอกถึงปริมาณทั้งหมดของโลหะ ส่วนรูปฟอร์มของโลหะประจุสองบวกนั้น (Zn^{2+} , Cd^{2+} , และ Pb^{2+}) บอกถึงการกระจายตัวของโลหะในธรรมชาติ โดยรูปฟอร์มมีผลกระทบต่อระบบสิ่งมีชีวิตได้มากที่สุด การหารูปฟอร์มนี้ใช้เทคนิคของการแยกประจุโดยใช้เรซินจับกับโลหะประจุสองบวก แล้วคำนวณหาปริมาณจากค่าความจุของเรซินเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่ในสารละลายก่อนและหลังการเกิดสมดุลกับเรซิน ความสัมพันธ์ของโลหะทั้งสามระหว่างปริมาณทั้งหมดกับโลหะประจุสองบวกจะมีความเป็นตรง โดยมีค่าความสัมพันธ์ (R^2) ของ Zn/Zn^{2+} มีค่า 96.43%, Cd/Cd^{2+} มีค่า 98.46% และ Pb/Pb^{2+} มีค่า 99.99% ตามลำดับ ความสัมพันธ์นี้อาจจะมีค่าแตกต่างกันตามสถานะแวดล้อมของดินที่ศึกษา (Knight et al., 1998)

6. เอกสารอ้างอิง

1. Homle P. E., Christensen T. H., Tjell J. C. and McGrath S. P. (1995) Speciation of cadmium and zinc with application to soil solutions: heavy metals in the environment. *Journal of Environmental Quality*, **24**, 183-190.
2. Knight B.P., Chaudri A. M., McGrath S. P. and Giller K. E. (1998) Determination of chemical availability of cadmium and zinc in soils using inert soil moisture samplers. *Environmental Pollution*, **99**, 293-298.
3. McGrath S. P., Knight B., Killham K., Preston S. and Paton G. I. (1999) Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a lux-based biosensor. *Environmental Science and Technology*, **18**, 659-663.
4. van Leeuwen H. P. (1999) Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. *Environmental Science and Technology*, **33**, 3743-3748.

บทที่ 3

การวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิด

1. บทนำ

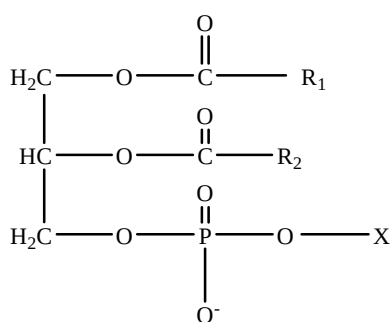
การวิเคราะห์กรดไขมันฟอสโฟไลปิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพได้ เพื่อบอกชนิด กลุ่ม และลักษณะของแบคทีเรียในธรรมชาติได้ ตัวชี้วัดทางชีวภาพนี้สามารถบอกสถานะทางธรรมชาติของระบบนิเวศได้เช่นกัน และยังบอกถึงผลกระทบของการปนเปื้อนที่มีอิทธิพลต่อระบบของตัวชี้วัดทางชีวภาพนี้ นั่นคือ สามารถบอกความสัมพันธ์ของชนิดและปริมาณของสารมลพิษที่มีต่อปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่สกัดได้ด้วย โดยกรดไขมันนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ phospholipid fatty acids (PLFAs) ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวมวลรวม กลุ่มของประชากร และความหลากหลายทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อม ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (bioindicator) ของแบคทีเรียนี้แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ตัวชี้วัดทางชีวภาพทั่วไป ซึ่งจะสัมพันธ์โดยตรงกับชีวมวลรวม (total biomass) และตัวชี้วัดเฉพาะจะบอกถึงกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่จำเพาะเจาะจงลงไป เช่น palmitic acid จัดเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพทั่วไป เพราะพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ส่วนกลุ่มที่เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพแบบเฉพาะเจาะจงบางตัว สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ตัวชี้วัดของกรดไขมันที่ใช้จัดกลุ่มจุลินทรีย์บางกลุ่ม (Vestal and White, 1989)

Lipid marker	Organisms
i15:0, a15:0, 15:0, 16:1 ω 5, i17:0, 17:0, 18:1 ω 7	แบคทีเรียทั่วไป
Branched PLFAs	แกรมบวก แบคทีเรีย
Mono-unsaturated PLFAs	แกรมลบ แบคทีเรีย
10Me18:0	Actinomycetes
18:2 ω 6c, 18:3 ω 6c, 18:3 ω w3c	เชื้อรา
16:1 ω 8c, 16:1 ω 6c	Methanotroph I
18:1 ω 8c, 18:1 ω 8t, 18:1 ω 6c	Methanotroph II
18:2 ω 6	Cyanophytes
16:1 ω 13t, 18:3 ω 3, 18:1 ω 9	Green algae
20:2 ω 6, 20:3 ω 6, 20:4 ω 6	Protozoa

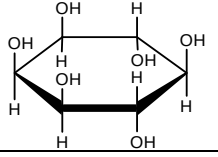
องค์ประกอบของเซลล์แมมเบรนเกือบ 60% เป็นไขมัน ได้แก่ phosphoglyceride, sphingomyelin และคลอโรสสเตอร์อล และอีก 40% เป็นโปรตีน Phospholipid fatty acids เป็นกลุ่มที่

เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์แมมเบรนของเซลล์สิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่ควบคุมการเข้าออกของสารต่างๆ ภายในเซลล์ จะมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตตายลงไป เพราะว่าเอนไซม์ของเซลล์ จะไฮโดรไลส์หมู่ฟอสเฟสหลังจากเซลล์ตายลง PLFAs ไม่พบในไขมันที่มีการเก็บกักไว้ (Seager and Slabaugh, 2000) รูป 1.1 แสดงโครงสร้างทั่วไปของ PLFA ส่วนตารางที่ 1.2 แสดงประเภทของ PLFAs ตามหมู่ของ X ที่เข้ามาจับกับหมู่ฟอสเฟส



รูป 1.1 โครงสร้างของ PLFA

ตารางที่ 1.2 ประเภทของ PLFAs

หมู่ X	ชื่อของฟอสโฟไลปิด
H มาจากน้ำ	Phosphatidic acid
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ (ethanolamine)	Phosphatidylethanolamine
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ (Choline)	Phosphatidylcholine
 (myoinositol)	Phosphatidylinositol
$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ (Glycerol)	Phosphatidylglycerol

ในธรรมชาติ PLFAs นั้นจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ของกรดไขมัน เพราะเกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพของคาร์บอน 2 อะตอมเป็นหลักในแต่ละครั้ง โดยทั่วไป PLFAs จะมีกรดไขมันที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัวอยู่อย่างละ 1 โมเลกุล สายของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวอาจจะมีพันธะคู่ได้ถึง 6 คู่แบบซิส โอกาสที่จะพบกรดไขมันแบบ polyunsaturated ในเซลล์แมมเบรนของจุลินทรีย์นั้นน้อยส่วนใหญ่พบได้ในระบบสิ่งแวดล้อมทางทะเล

องค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียสามารถใช้เป็นข้อมูลในการบอกถึงสภาพธรรมชาติที่เกี่ยวข้อง โดยอาจจะมีความสัมพันธ์กันได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ข้อมูลขององค์ประกอบของผนังเซลล์นี้ใช้เป็นค่าดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ เมื่อสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางองค์ประกอบของกรดไขมันของผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้เช่นกัน องค์ประกอบทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวัดค่าของ PLFAs ได้ ความแตกต่างในกลุ่มย่อยๆ ของแบคทีเรียจะมีความแตกต่างในรูปแบบของ PLFA ด้วย และใช้บอกถึงลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียในอาศัยอยู่ในธรรมชาติ รูปแบบของ PLFAs ไม่อาจจะใช้บอกถึงสปีชีส์ที่จำเพาะเจาะจงลงไปได้ แต่จะให้ภาพรวมของกลุ่มมากกว่า

การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของ PLFAs นั้นทำได้โดยการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ Fatty Acids Methyl Esters (FAMES) ซึ่งสามารถวัดได้โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส FAMES

เป็นกลุ่มสารที่ระเหยง่ายและวิธีการเตรียมสารอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดไขมันก็เป็นปฏิกิริยาที่เตรียมได้ง่ายและให้ประสิทธิภาพสูง (Drenovsky et. al., 2004) ลักษณะองค์ประกอบของกรดไขมันที่หาได้จาก PLFAs ของผนังเซลล์ของแบคทีเรียต่างๆ นั้นใช้บอกถึงปัจจัยต่างๆ เช่น ค่าชีวมวลของแบคทีเรีย ใช้ในการจำแนกกลุ่ม บอกลักษณะโครงสร้างชีวมวลของแบคทีเรีย บอกถึงความหลากหลาย บอกเมตาบอลิซึม และสภาพของสารอาหารในระบบที่ศึกษาได้ (Frostegard et al., 1993; Virtue et al., 1996; Rajapalsha et al., 2004)

การวิเคราะห์ PLFAs จะประกอบด้วยขั้นตอนหลักดังนี้ การสกัดไขมันจากตัวอย่างด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม การแยกไขมันเป็นกลุ่มต่างๆ (neutral lipid, glycol-lipid และ phospho-lipid) ด้วยเทคนิค solid phase extraction โดยมีตัวชะเป็นคลอโรฟอร์ม อะซิโตน และเมทานอลตามลำดับ การทำ saponification ของ phospholipids เพื่อแยกเอากรดไขมันอิสระออกมา การเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) ด้วยปฏิกิริยา methylation และขั้นตอนสุดท้ายการวัด FAMES ด้วยเทคนิคทางแก๊สโครมาโทกราฟี

2. วัตถุประสงค์

- (1) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ FAMES ด้วยเครื่อง GC-FID
- (2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม FAMES จากกรดไขมัน
- (3) ศึกษาการวิเคราะห์ PLFAs ในตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจากธรรมชาติ
- (4) ศึกษาขั้นตอนที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่าง Solid Phase Extraction (SPE)

3. การทดลอง

การหาสภาวะที่เหมาะสมของ GC-FID สำหรับการวิเคราะห์ FAMES ใช้สารมาตรฐานกรดไขมัน lauric acid, myristic acid, palmitic acid, heptadecanoic acid, stearic acid และ arachidic acid ขั้นตอนการเปลี่ยนกรดไขมันเป็น fatty acid methyl esters (FAMES) ใช้เทคนิค derivatization กรดไขมันด้วยเมทานอลโดยมีกรดและ boron trifluoride (BF_3) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

การวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพใช้เครื่อง GC-14B ยี่ห้อ Shimadzu (Japan) โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ Flame Ionization Detector (FID) ใช้เครื่องแปลผลโครมาโทแกรม PowerChrom มีสภาวะการทดลองดังแสดงในตาราง 3.1

ตาราง 3.1 สภาวะของเครื่อง GC-FID

Injector mode	Splitless
Injection volume	1 µl
Injector temperature	250 °C
Detector temperature	280 °C
Temperature program	60 °C (2 min), 20 °C/min → 180 °C (0.5 min), 5 °C/min → 240 °C (10 min)
Column used	HP-5 (5% Me Ph Silicone, 30mx i.d.0.32mm x 0.11µm film thickness)
Carrier gas	He
Fuel gas	Hydrogen
Oxidant gas	Air zero
Make up gas	Nitrogen

เครื่องมืออื่นๆ ที่มีการใช้งานด้วย ได้แก่ Centrifuge (Model MSE, Sanyo), Shaker (Model 3006, GFL), Vortex Genie 2 (N.Y., USA), Heating block/ Hot plat & Stirrer

3.2 สารเคมีและวัสดุ

ดังแสดงในตาราง 3.2

ตาราง 3.2 รายการสารเคมีและวัสดุที่ใช้

สารเคมีและวัสดุ	suppliers
Lauric acid (12:0, 96% assay)	Fluka, Switzerland
Myristic acid (14:0, 98% assay)	Fluka, Switzerland
Palmitic acid (16:0)	BDH, England
Stearic acid (18:0, 97% assay)	Fluka, Switzerland
Arachidic acid (20:0, 99% assay)	Fluka, Switzerland
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate Monosodium salt (98% assay)	Fluka, Switzerland
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate Monosodium salt (98% assay)	Fluka, Switzerland
1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphate Monosodium salt (98% assay)	Fluka, Switzerland
Boron trifluoride	BDH, England
Solvents; Hexane, Chloroform, methanol, acetone	LabScan, Ireland
Silicic, Florisil, Silica	

3.3 วิธีการทดลอง

เตรียมกรดไขมันมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm ของ lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0) และ arachidic acid (20:0) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ด้วย GC-FID และประเมินค่าการวิเคราะห์ FAMES ที่ได้ เพื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียม FAMES มีวิธีการดังต่อไปนี้

3.3.1 Derivatization method with acids in methanol

(1) ผลของกรด HCl ใน Methanol

ปิเปตสารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลองแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 mL ด้วยเฮกเซน จากนั้นเติมสารละลายผสมของกรด HCl ใน Methanol 1.0 mL ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ของกรด HCl เป็น 0.5, 1.0, 5.0 และ 10% (v/v) แล้วให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน ทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

(2) ผลของกรด H_2SO_4 ใน Methanol

ปิเปตสารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลองแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 mL ด้วยเฮกเซน จากนั้นเติมสารละลายผสมของกรด H_2SO_4 ใน Methanol 1.0 mL ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ของกรด H_2SO_4 เป็น 0.5, 1.0, 5.0 และ 10% (v/v) แล้วให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

(3) ผลของอุณหภูมิที่ใช้เตรียม FAMES

ปิเปตสารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลองแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 mL ด้วยเฮกเซน จากนั้นเติมสารละลายผสมของกรด 5% (v/v) H_2SO_4 ใน Methanol 1.0 mL แล้วให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}\text{C}$ (อุณหภูมิห้อง), 50 $^{\circ}\text{C}$ และ 60 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการปรับปริมาตร FAMES ด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

(4) ผลของเวลาที่ใช้ในการเตรียม FAMES

ปิเปตสารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 mL ด้วยเฮกเซน จากนั้นเติมสารละลายผสมของกรด 5% (v/v) H_2SO_4 ใน Methanol 1.0 mL แล้วให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการปรับปริมาตร FAMES ด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

3.3.2 Derivatization method with 14% (v/v) boron trifluoride in methanol

ใช้ BF_3 จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเตรียม FAMES

(1) ผลของอุณหภูมิที่ใช้เตรียม FAMES

ปิเปตสารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรเป็น 1 mL ด้วยเฮกเซน จากนั้นเติมสารละลาย 14%(v/v) BF_3 ใน Methanol 50 μL แล้วให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 25 °C (อุณหภูมิห้อง), 50 °C และ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายอิ่มตัว NaCl แล้วทำแล้วสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ส่วนที่เหลือทำการปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

(2) ผลของเวลาที่ใช้เตรียม FAMES

ปิเปตสารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 mL ด้วยเฮกเซน จากนั้นเติมสารละลาย 14%(v/v) BF_3 ใน Methanol 50 μL แล้วให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 และ 10 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายอิ่มตัว NaCl ทำการสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย

3.3.3 Saponification

ทำการผสมสารละลายกรดไขมันฟอสโฟไลปิดกับสารละลายเบส เพื่อเป็นการแยกเอากรดไขมันอิสระออกจากกรดไขมันฟอสโฟไลปิด ในการทดลองศึกษาผลของกระบวนการ saponification จาก Phospholipid Fatty Acids ของเกลือ 1,2- dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium และ 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium ที่เตรียมในคลอโรฟอร์ม ด้วยสารละลาย 0.1 M NaOH

(1) ผลของอุณหภูมิ

- ปิเปตสารละลายเกลือของกรดไขมันฟอสโฟไลปิดความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลองแล้วปรับปริมาตรเป็น 0.5 mL ด้วยเฮกเซน เติมสารละลาย 0.1 M NaOH ปริมาตร 0.5 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วให้ความร้อนแก่สารละลายที่อุณหภูมิ 25 °C (อุณหภูมิห้อง), 50 °C, 70 °C และ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
- methylation ด้วยสารละลาย 5%(v/v) H_2SO_4 ใน methanol 1 mL ให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายอิ่มตัว NaCl แล้วสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

(2) ผลของเวลา

- ปิเปตสารละลายเกลือของกรดไขมันฟอสโฟไลปิดความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลองแล้วปรับปริมาตรเป็น 0.5 mL ด้วยเฮกเซน เติมสารละลาย 0.1 M NaOH ปริมาตร 0.5 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วให้ความร้อนแก่สารละลายที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
- methylation ด้วยสารละลาย 5%(v/v) H_2SO_4 ใน methanol 1 mL แล้วให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายอิ่มตัว NaCl ทำการสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

3.3.5 Solid phase extraction for lipid fractionation

เทคนิค SPE เป็นเทคนิคที่นำมาใช้เพื่อจำแนกกลุ่มของกรดไขมัน เป็นการแยกกลุ่มของกรดไขมันออกจากกันก่อนการวิเคราะห์ ลดการรบกวนจากระบบการวิเคราะห์ด้วย GC เพิ่มประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ ในการทดลองจะศึกษาผลของกระบวนการ saponification จาก Phospholipid Fatty Acids ของเกลือ 1,2- dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium และ 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium ที่เตรียมในคลอโรฟอร์ม

(1) Packing materials optimization

- เลือกใช้ Silica, Silicic และ Florisil เตรียม SPE คอลัมน์โดยซัง Packing materials 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 g ลงในคอลัมน์ขนาดเล็ก ต่อ SPE คอลัมน์ กับ vacuum manifold unit จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มตามลำดับ

- Load สารละลายกรดไขมันฟอสโฟไลปิด 100 ppm ปริมาตร 50 μ L ลงใน SPE คอลัมน์
- Washing step ใช้ 1:1 Chloroform:Acetone ปริมาตร 5.0 mL
- Elution ใช้ methanol 20 mL ชะ phospholipids fatty acid ออกมาเก็บส่วน fraction นี้ไว้
- แล้วทำการ Saponified ด้วย 0.1 M NaOH ปริมาตร 5 mL เขย่าให้เข้ากัน ให้ความร้อนแก่สารละลายที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
- methylation ด้วยสารละลาย 5%(v/v) H₂SO₄ ใน methanol 5 mL ให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายอิ่มตัว NaCl แล้วทำการสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

(2) ปริมาตรของ Elution

- Silica SPE column 0.3 g ต่อคอลัมน์กับ vacuum manifold unit ล้าง SPE คอลัมน์ด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มตามลำดับ
- Load สารละลายกรดไขมันฟอสโฟไลปิด 100 ppm ปริมาตร 50 μ L ลงใน SPE คอลัมน์
- Washing step ใช้ 1:1 Chloroform:Acetone ปริมาตร 10 mL
- Elution ใช้ methanol ปริมาตร 5, 10, 15 และ 20.0 mL ชะ phospholipid fatty acids ออกมาเก็บส่วน fraction นี้ไว้
- นำสารละลาย PLFAs มาทำการ Saponified ด้วย 0.1 M NaOH ปริมาตร 5 mL เขย่าให้เข้ากัน ให้ความร้อนแก่สารละลายที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
- methylation ด้วยสารละลาย 5%(v/v) H₂SO₄ ใน methanol 5 mL แล้วให้ความร้อนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายอิ่มตัว NaCl แล้วทำการสกัด FAMES ด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 mL จำนวน 3 ครั้ง ผสมสารละลายทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน 1.0 mL สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 วิธีการเตรียม FAMES

วิธีการเตรียมอนุพันธ์ของ fatty acid methyl ester (FAME) นั้นใช้ methanol โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ทำให้เกิดปฏิกิริยา methylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ง่ายและเกิดได้สมบูรณ์ ในขั้นตอนการศึกษาได้ใช้กรด HCl และ H_2SO_4 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ BF_3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วย จากสถานะของการทำปฏิกิริยาปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้จะเป็นตัวแปรหลักในการศึกษา เพราะส่งผลต่อค่าพื้นที่ใต้กราฟที่วัดได้จากเครื่อง GC-FID

4.1.1 การเตรียม FAMES ด้วย HCl/methanol

อนุพันธ์ของ FAMES ที่เกิดจากการเตรียมด้วย HCl ใน methanol ที่ความเข้มข้นของกรดเป็น 0.5, 1.0, 5 และ 10% (v/v) แสดงผลได้ดังรูป 4.1.1 พบว่าที่ความเข้มข้น 1% (v/v) HCl ใน methanol ให้ค่าสัญญาณของพื้นที่ใต้กราฟสูงที่สุด ดังนั้นค่าความเข้มข้นนี้จึงเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับใช้กรด HCl เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการเกิดเป็นเอสเทอร์ด้วยเมทานอล ส่วนที่ความเข้มข้นของ HCl น้อยกว่า 1% ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟน้อยแสดงว่าปฏิกิริยาในการเกิดเป็น FAMES ยังไม่สมบูรณ์ยังมีกรดไขมันบางส่วนที่ยังไม่เกิดปฏิกิริยา ส่วนที่ความเข้มข้นของกรด HCl เป็น 10% นั้นค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ลดลง แสดงว่าเนื้อกรดอาจจะทำลายสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็เป็นได้

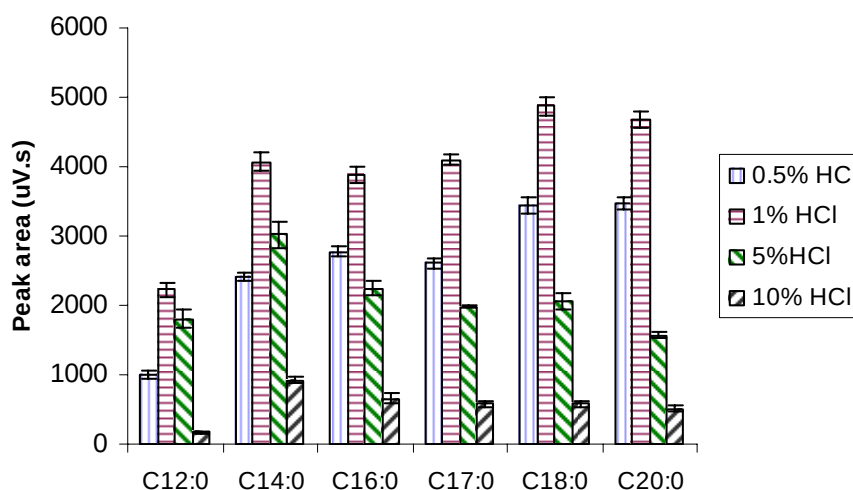


Figure 4.1.1 Effects of HCl concentrations in methanol on peak area for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), and arachidic acid (C20:0).

4.1.2 การเตรียม FAMES ด้วย H_2SO_4 /methanol

อนุพันธ์ของ FAMES ที่เกิดจากการเตรียมด้วย H_2SO_4 ใน methanol ที่ความเข้มข้นของกรดเป็น 0.5, 1.0, 5 และ 10% (v/v) แสดงผลได้ดังรูป 4.1.2 พบว่าที่ความเข้มข้น 5% (v/v) H_2SO_4 ใน methanol ให้ค่าสัญญาณของพื้นที่ใต้กราฟสูงที่สุด ดังนั้นค่าความเข้มข้นนี้จึงเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับใช้กรด HCl เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการเกิดเป็นเอสเทอร์ด้วยเมทานอล ส่วนที่ความเข้มข้นของ H_2SO_4 น้อยกว่า 5% ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟน้อยแสดงว่าปฏิกิริยาในการเกิดเป็น FAMES ยังไม่สมบูรณ์ยังมีกรดไขมันบางส่วนที่ยังไม่เกิดปฏิกิริยา ส่วนที่ความเข้มข้นของกรด H_2SO_4 เป็น 10% นั้นค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้น้อยลง แสดงว่าเนื้อกรดอาจจะทำลายสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็เป็นได้

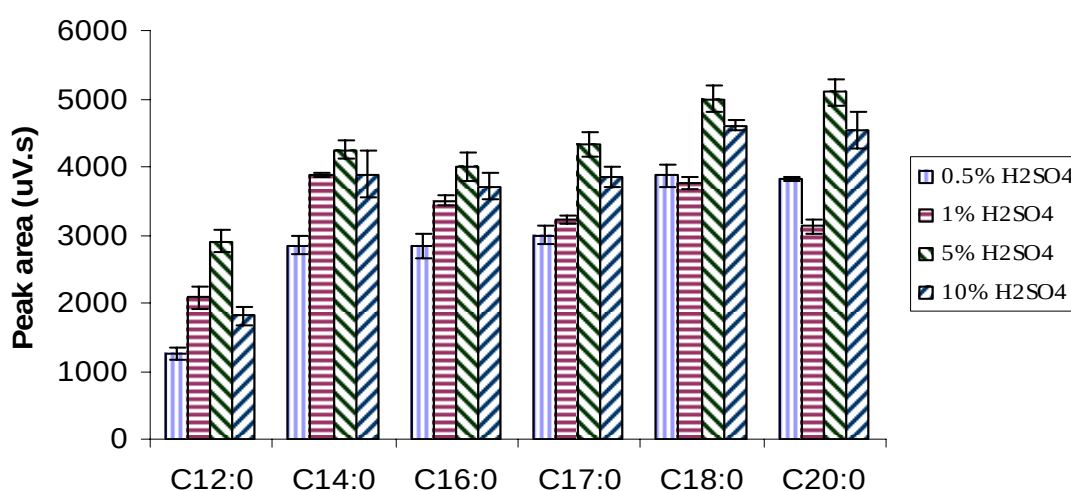


Figure 4.1.2 Effects of H_2SO_4 concentration on peak area for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), and arachidic acid (C20:0).

4.1.3 การเปรียบเทียบการเตรียม FAMES ด้วย HCl และ H_2SO_4

อนุพันธ์ของ FAMES ที่เกิดจากการเตรียมด้วยกรด 1% HCl และ 5% H_2SO_4 ใน methanol แสดงผลได้ดังรูป 4.1.3 โดยทำการเปรียบเทียบข้อมูลของสัญญาณพื้นที่ใต้กราฟของค่าความเข้มข้นของกรดที่ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงสุด นั่นคือ กรด HCl เป็น 1% (v/v) ในเมทานอล ส่วนกรด H_2SO_4 เป็น 5% (v/v) ในเมทานอล ซึ่งผลการทดลองสามารถใช้กรด HCl และ H_2SO_4 ได้ทั้งสองชนิดในการเตรียมอนุพันธ์ของ FAMES จากกรดไขมัน โดยมีสภาวะที่ทำการทดลองที่อุณหภูมิ $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ใช้เวลา 10 นาที ในการทำปฏิกิริยา

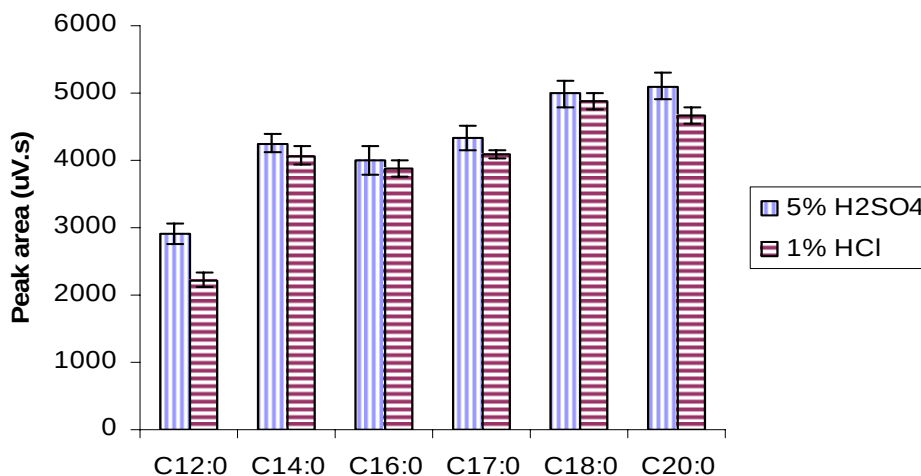


Figure 4.1.3 Comparison of peak area between 5% H₂SO₄ and 1% HCl for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), and arachidic acid (C20:0).

จากการเปรียบเทียบผลของการใช้กรดแตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา methylation ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียม methyl esters โดยศึกษาตัวแปร 2 ตัว คือ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในหัวข้อ 4.1.4 และ 4.1.5 โดยเลือกใช้กรด 5% (v/v) H₂SO₄ ในการศึกษาเพียงอย่างเดียว

4.1.4 ผลของอุณหภูมิต่อการเตรียม FAMES

ผลของอุณหภูมิต่อการเตรียมอนุพันธ์ของ FAMES จากกรด 5% (v/v) H₂SO₄ ใน methanol แสดงผลได้ดังรูป 4.1.4 พบว่าที่อุณหภูมิ 50 °C และ 60 °C ให้ค่าสัญญาณของพื้นที่ใต้กราฟสูงสุด ซึ่งทั้งสองอุณหภูมิที่ใช้สำหรับจำนวนคาร์บอน 14 อะตอมขึ้นไปมีค่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ยกเว้น C12:0 ค่าอุณหภูมิ 50 °C ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงสุด จากผลที่ได้การใช้อุณหภูมิในช่วง 50 - 60 °C สามารถใช้ได้ในการเตรียมอนุพันธ์ของ methyl esters ของกรดไขมัน

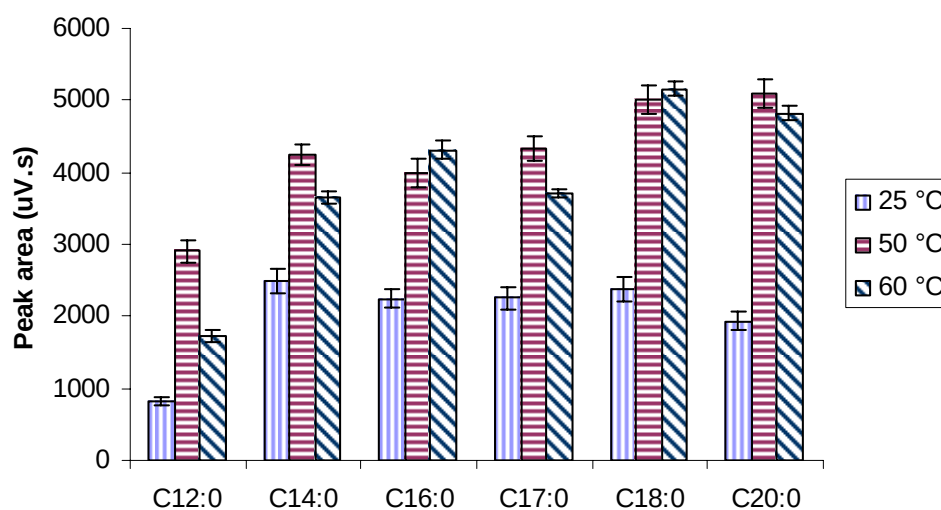


Figure 4.1.4 Effects of reaction temperature for 5% H_2SO_4 in methanol methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), and arachidic acid (C20:0).

4.1.5 ผลของเวลาต่อการเตรียม FAMES

ผลของเวลาที่ใช้ต่อการเตรียมอนุพันธ์ของ FAMES จากกรด 5% (v/v) H_2SO_4 ใน methanol โดยอุณหภูมิให้คงที่ที่ 50 °C แสดงผลได้ดังรูป 4.1.5 การทดลองได้ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจาก 5 นาที จนถึง 30 นาทีพบว่าที่เวลา 10 นาที อนุพันธ์ของ C12:0, C14:0, C17:0 และ C20:0 ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงสุด ที่เวลา 20 นาที อนุพันธ์ของ C16:0 และ C18:0 ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงสุด จากรูป 4.1.5 นั้นพอได้แนวโน้มของช่วงเวลาที่สามารถใช้ได้ในการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 10 – 20 นาที เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ methyl esters ของกรดไขมันเหล่านี้

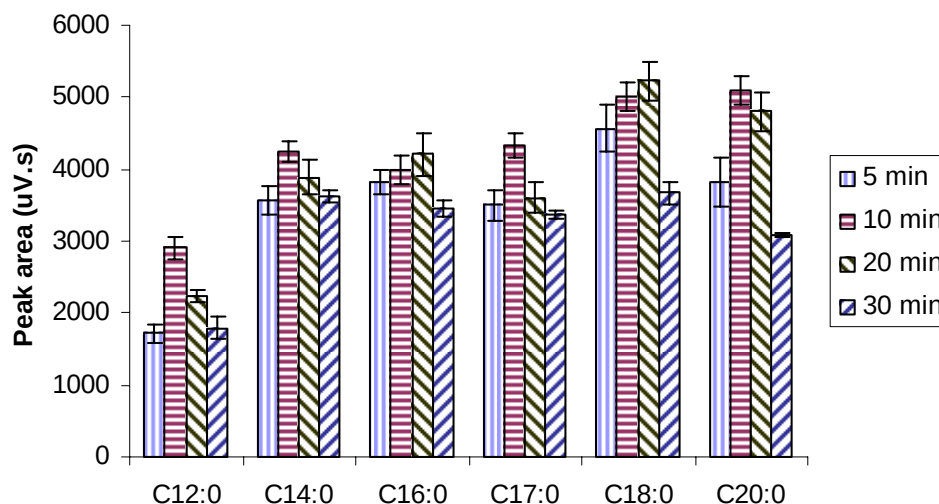


Figure 4.1.5 Effects of reaction time for 5% H_2SO_4 in methanol methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), and arachidic acid (C20:0).

4.1.6 การเตรียม FAMES ด้วย 14% BF_3 /methanol

การเตรียมอนุพันธ์ของ FAMES ด้วย BF_3 ในเมทานอล สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้เช่นกัน จากผลการทดลองที่ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาให้ผลดังรูปที่ 4.1.6 และ 4.1.7 ตามลำดับ

รูป 4.1.6 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยา methylation ของกรดไขมันเพื่อให้ได้ FAMES ค่าสัญญาณพื้นที่ได้กราฟสูงสุดพบได้ที่อุณหภูมิ 50°C ซึ่งเราจะใช้ค่าอุณหภูมินี้ในการศึกษาถึงเวลาที่ทำปฏิกิริยาต่อไป ส่วนรูป 4.1.7 เป็นกราฟที่แสดงถึงเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของ BF_3 ในเมทานอล ซึ่งพบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ 20 – 30 นาที จากค่าสัญญาณสูงสุดของพื้นที่ได้กราฟที่วัดได้จากเครื่อง GC-FID

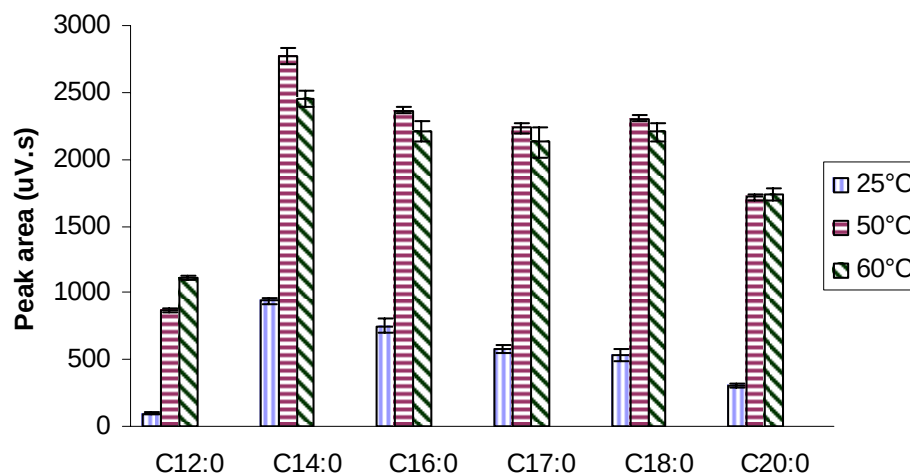


Figure 4.1.6 Effects of reaction temperature of 14% BF_3 in methanol for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), and arachidic acid (C20:0).

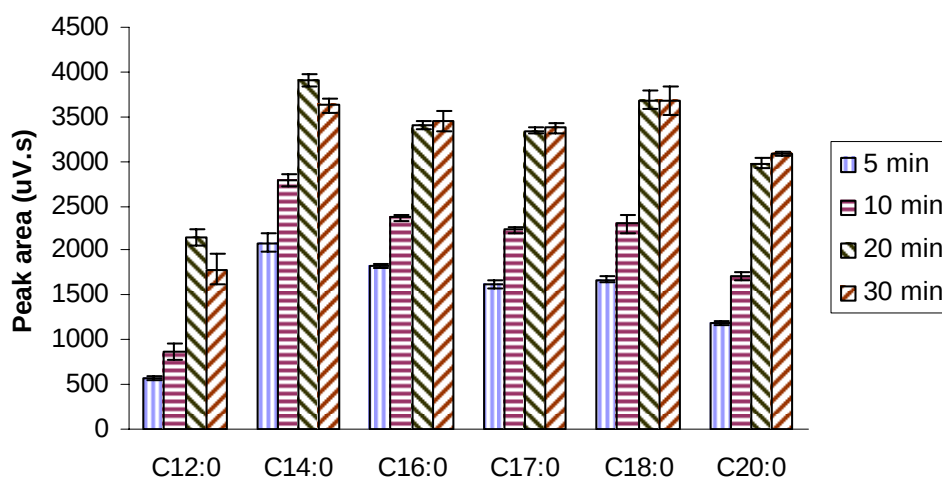


Figure 4.1.7 Effect of reaction time of 14% BF_3 in methanol for methylation of lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), and arachidic acid (C20:0).

4.2 Analytical performance

การประเมินเครื่อง GC-FID เป็นหาความเหมาะสมของเครื่องมือวัด โดยพิจารณาจากตัวแปรทางด้านการวิเคราะห์ได้แก่ ช่วงของความเข้มข้นที่เครื่องมือตอบสนอง ค่าความเป็นเส้นตรง ค่าการวิเคราะห์ต่ำสุดและปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ เสถียรภาพของเครื่องมือ เป็นต้น ซึ่งค่าเหล่านี้ศึกษาจากการฉีดสารอนุพันธ์ของ fatty acid methyl ester (FAME) แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยสภาวะการทดลองที่เหมาะสม โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ FAMEs มาตรฐาน แสดงได้ดังรูป 4.2.1 และ 4.2.2 จากการวิธีการเปลี่ยนอนุพันธ์กรดไขมันด้วยกรดซัลฟูริกและ BF_3 ตามลำดับ

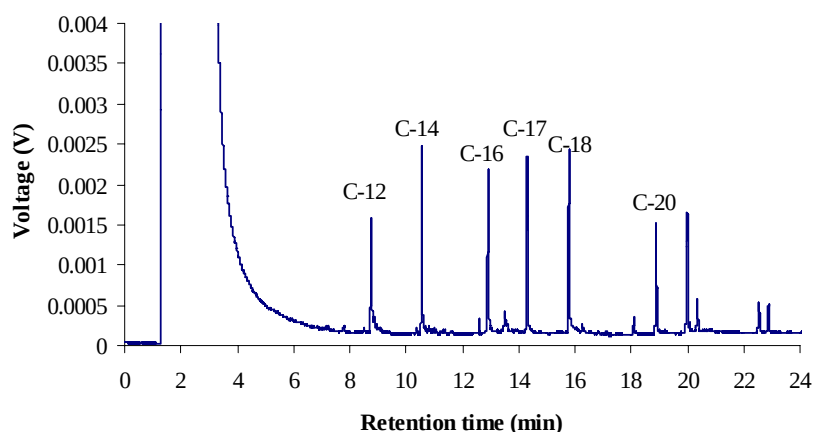


Figure 4.2.1 Chromatogram of FAMEs using 5% (v/v) H_2SO_4 in methanol as derivatizing agents: methyl laurate (MeC12:0), methyl myristate (MeC14:0), methyl palmitate (MeC16:0), methyl heptadecanoate (MeC17:0), methyl stearate (MeC18:0), methyl arachidate (MeC20:0).

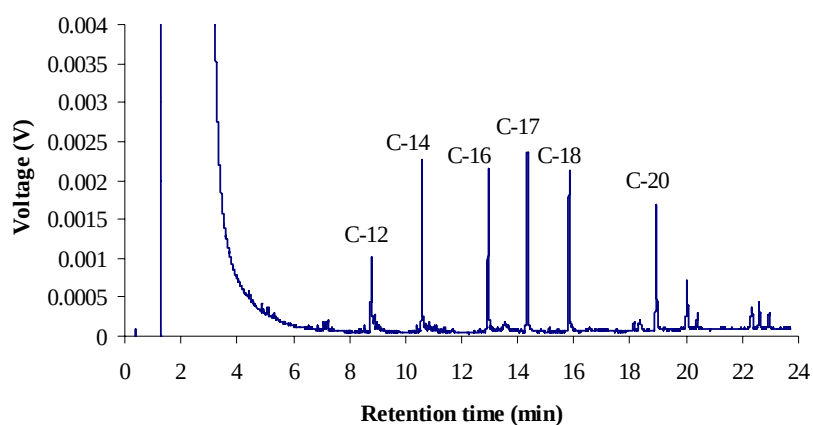


Figure 4.2.2 Chromatogram of FAMEs using 14% (v/v) BF_3 in methanol as derivatizing agents: methyl laurate (MeC12:0), methyl myristate (MeC14:0), methyl palmitate (MeC16:0), methyl margarate (MeC17:0), methyl stearate (MeC18:0), methyl arachidate (MeC20:0).

ค่าทางวิเคราะห์ FAMES ด้วยเครื่องมือ GC-FID นี้สามารถแสดงได้ดังตาราง 4.2.1 และ 4.2.2 สำหรับการทำปฏิกิริยาด้วย 5% (v/v) H_2SO_4 ในเมทานอล และ 14% (v/v) BF_3 ในเมทานอล

ตาราง 4.2.1 Analytical performance ของเครื่อง GC-FID จากการวิเคราะห์ FAMES ที่เตรียม 5% (v/v) H_2SO_4 ในเมทานอล

FAMES	Regression line equation ⁽¹⁾	R^2	% RSD ⁽²⁾	Detection limit (ppm) ⁽³⁾	Linearity range (ppm)
methyl laurate	$y = 562.91x + 337.15$	0.9913	6.55	0.14	0.5-100
methyl myristate	$y = 865.65x + 140.69$	0.9996	2.96	0.06	0.5-100
methyl palmitate	$y = 933.76x - 682.04$	0.9940	3.04	0.07	0.1-100
methyl heptadecanoate	$y = 1177.3x - 2331$	0.9906	3.29	0.09	0.5-100
methyl stearate	$y = 1143.1x - 944.72$	0.9935	3.01	0.14	0.2-100
methyl arachidate	$y = 972.24x + 231.87$	0.9995	6.45	0.10	0.2-100

(1) Regression line correlation coefficient of peak area.

(2) %RSD = Relative standard deviation (n=3) at concentration of 1 ppm

(3) 3 times of standard deviation

ตาราง 4.2.2 Analytical performance ของเครื่อง GC-FID จากการวิเคราะห์ FAMES ที่เตรียมจาก 14% (v/v) BF_3 ในเมทานอล

FAMES	Regression line equation ⁽¹⁾	R^2	% RSD ⁽²⁾	Detection limit (ppm) ⁽³⁾	Linearity range (ppm)
methyl laurate	$y = 519.21x - 378.56$	0.9998	2.05	0.09	0.5-100
methyl myristate	$y = 1029.9x - 1611.4$	0.9945	7.14	0.08	0.5-100
methyl palmitate	$y = 782.17x - 494.36$	0.9974	2.95	0.17	0.2-100
methyl heptadecanoate	$y = 828.15x - 1108.1$	0.9964	2.35	0.07	0.5-100
methyl stearate	$y = 852.62x - 437.02$	0.9994	2.22	0.15	0.2-100
methyl arachidate	$y = 631.2x - 502.25$	0.9972	7.14	0.14	0.5-100

(1) Regression line correlation coefficient of peak area.

(2) %RSD = Relative standard deviation (n=3) at concentration of 1 ppm

(3) 3 times of standard deviation

4.3 การวิเคราะห์ PLFAs

การวิเคราะห์ PLFAs ศึกษาโดยการวิเคราะห์จาก phospholipids fatty acids เลือกใช้เกลือของ 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium salt และ 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium เป็นสารในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกกรดไขมันออกมาจาก PLFAs ด้วยวิธีการทำให้เกิดสบู่ (saponification) จากนั้นเปลี่ยนกรดไขมันที่แยกออกมาด้วยปฏิกิริยา methylation โดยใช้สารละลายกรดในเมทานอล หรือ BF_3 ในเมทานอลจากวิธีการที่เหมาะสมในตอนต้นที่กล่าวมาแล้ว

4.3.1 Saponification method

การแยกเอากรดไขมันใน PLFAs ออกมาศึกษาโดยใช้เบส NaOH ความเข้มข้น 0.1 M โดยเบสจะไปดึงเอากรดไขมันออกมาจากโครงสร้างหลักของ phosphate glycerol โดย 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium จะได้ myristic acid ($\text{C}_{14:0}$), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium ได้ palmitic acid ($\text{C}_{16:0}$) และ 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium ได้ stearic acid ($\text{C}_{18:0}$) ปัจจัยที่ส่งผลต่อการปลดปล่อยกรดไขมันที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับเบส จากนั้นก็เปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ของ fatty acid methyl ester (FAME) แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID จากสภาวะการทดลองที่เหมาะสม

(1) Effect of reaction temperature

ผลการทดลองแสดงได้ดังรูป 4.3.1 เป็นผลของอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ saponification พบว่าที่อุณหภูมิ 70 °C ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟเหมาะสมที่สุดสำหรับ FAMEs ที่ได้

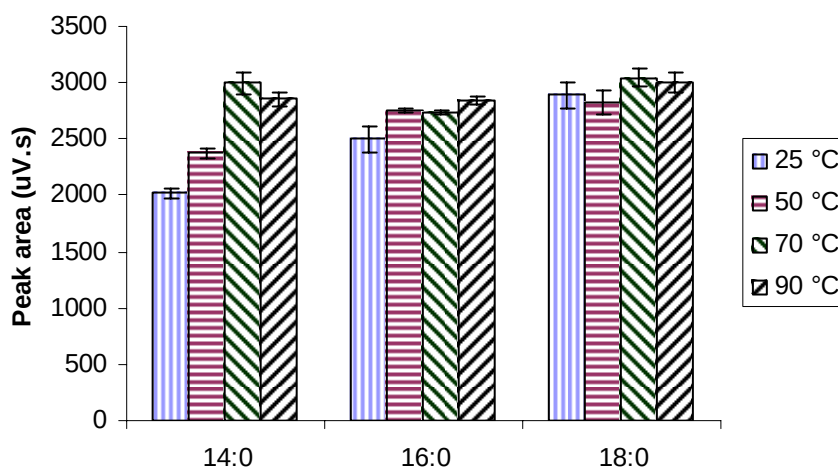


Figure 4.3.1 Effect of reaction temperature on peak area for saponified PLFAs of myristic acid (14:0), palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0).

(2) Effect of reaction time

ผลการทดลองแสดงได้ดังรูป 4.3.2 เป็นผลของเวลาที่ใช้ในกระบวนการ saponification โดยใช้อุณหภูมิที่ 70 °C พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 20 นาที ซึ่งจะให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟเหมาะสมที่สุดสำหรับ FAMEs ที่ได้

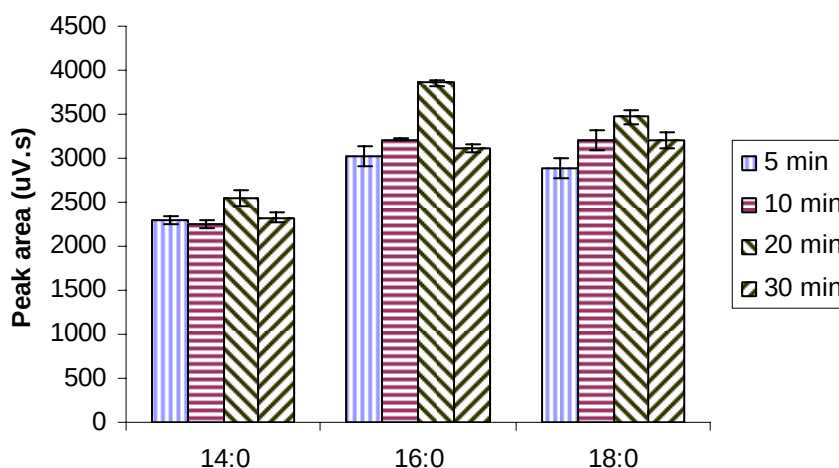


Figure 4.3.2 Effects of reaction time on peak area for saponified PLFAs of myristic acid (14:0), palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0).

4.3.2 Solid Phase Extraction for Lipid Fractionation

การแยกกรดไขมันสามารถจำแนกออกได้เป็น neutral-lipid, glyco-lipid และ phospho-lipid เทคนิค solid phase extraction (SPE) จะสามารถใช้แยกกลุ่มของไขมันออกจากกันเพื่อไม่ให้เกิดการรบกวนรูปแบบของ FAMEs ซึ่งกันและกัน โดยส่วนที่เราต้องการคือ phospholipids fatty acid (PLFAs) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์แบคทีเรีย

การทดลองในตอนนี้จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค SPE ประกอบด้วย การเลือกวัสดุดูดซับ (packing material) ในการบรรจุลงใน SPE คอลัมน์ การปรับสภาพคอลัมน์ (Conditioning) การใส่สารตัวอย่าง (Loading) การใช้ตัวทำละลายในการล้างคอลัมน์ (Washing) การใช้สารละลายในการชะสารที่ต้องการ (Elution) โดยสารตัวอย่างที่ใช้เป็น PLFAs มาตรฐานของเกลือ 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium และ 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium ในการ load ลง SPE คอลัมน์ โดยดูผลของ FAMEs ที่เป็น methyl myristate (MeC14:0), methyl palmitate (MeC16:0) และ methyl stearate (MeC18:0)

(1) Optimization of packing materials

ผลการทดลองจากการเลือกใช้วัสดุดูดซับสำหรับ SPE คอลัมน์เพื่อแยก PLFAs นั้นแสดงได้ดังตาราง 4.3.2.1 โดยการคำนวณค่าออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์การได้คืน (%recovery) การทดลองใช้ตัวดูดซับในช่วง 0.1 ถึง 0.5 g พบว่า Silicic ในช่วงน้ำหนัก 0.2 – 0.4 g เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมสำหรับการทดลอง เพราะค่า %recovery อยู่ในช่วงที่น่าพอใจ (70% – 100%) ซึ่งถ้าจะพิจารณาจาก FAMES ทุกตัว ส่วน Silica คำนานหนักที่ 0.3 g เป็นค่าที่เหมาะสม เพราะให้ค่า %recovery ในช่วง 68 – 91% ส่วน florisil ให้ค่าการได้ย้อยกลับที่ต่ำจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการแยกกลุ่มของ PLFAs นี้

ตาราง 4.3.1 Percent recovery of packing materials for PLFA of myristic, palmitic and stearic acid converted to FAMES.

PLFAs	Amount of packing (g)	Recovery (%) as FAMES					
		Silica	%RSD	Silicic	%RSD	Florisil	%RSD
Myristic	0.1	57.65	6.29	43.56	2.85	49.85	3.64
	0.2	60.41	2.85	82.32	6.04	33.00	2.04
	0.3	68.71	3.17	76.60	3.72	41.88	10.66
	0.4	46.27	5.97	98.80	5.30	36.11	0.85
	0.5	66.61	4.34	35.66	8.10	36.88	9.28
Palmitic	0.1	66.19	3.21	77.09	0.78	63.01	1.08
	0.2	72.00	3.19	80.21	4.36	69.74	2.80
	0.3	91.42	1.99	87.21	5.51	64.03	3.74
	0.4	71.86	2.42	108.43	1.82	65.69	3.59
	0.5	78.53	1.88	56.60	8.11	53.43	4.37
Stearic	0.1	52.43	3.90	27.25	0.27	53.52	2.25
	0.2	72.43	1.43	69.71	4.59	62.13	2.90
	0.3	76.95	2.54	73.73	4.88	58.65	1.37
	0.4	66.13	14.19	83.05	3.45	61.44	3.84
	0.5	73.93	2.13	35.03	9.78	55.48	2.28

(2) Elution volume

การทดลองนี้ศึกษาเฉพาะปริมาตรของสารละลายตัวชะ ในการชะ PLFAs สำหรับการวิเคราะห์ FAMES ในขั้นต่อไป โดยเลือก silica เป็นสารดูดซับปริมาณ 0.3 g แล้วทำการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเมทานอลจาก 5 mL จนถึง 20 mL ผลแสดงดังตาราง 4.3.2.2 โดยการคำนวณค่าออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์การได้คืน (%recovery) การทดลองพบว่าใช้เมทานอลในการชะ PLFAs ออกมา 20 mL จึงจะได้ค่า %recovery เป็นที่น่าพอใจ (62% – 94%) โดยที่ปริมาตรของเมทานอลเป็น 15 mL ก็ให้ผลของค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนสูงเช่นกัน (54 – 91%) ส่วนปริมาตรที่ต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนจะมีค่าน้อย จึงเป็นปริมาตรที่ไม่เหมาะสมในการทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่า PLFA ของ stearic acid นั้นมีค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ต่ำกว่า PLFA ของกรดไขมันตัวอื่นๆ ดังนั้นจึงจะเป็นปัญหาสำหรับกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนสูงก็ได้

ตาราง 4.3.2.2 Percent recovery of elution volume of methanol using SPE-silica 0.3 g for eluting PLFA of myristic, palmitic and stearic acid converted to FAMES.

PLFAs	% recovery of using methanol as eluting solvent (%RSD)							
	5.0 mL		10.0 mL		15.0 mL		20.0 mL	
Myristic (C14:0)	79.46	(2.45)	73.67	(2.90)	89.95	(1.88)	79.15	(3.08)
Palmitic (C16:0)	84.00	(3.73)	82.04	(3.61)	91.17	(1.58)	93.83	(3.00)
Stearic (C18:0)	44.09	(5.90)	43.56	(3.41)	53.54	(2.85)	62.15	(4.13)

4.4 รูปแบบของ PLFAs

การวิเคราะห์รูปแบบของ PLFAs ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มของ coliform จากตัวอย่างน้ำในธรรมชาติซึ่งจะแยกได้ 2 กลุ่มย่อยตามลักษณะที่เห็นของ colony โดย white colony เป็น non-coliform และ dark-colony (จะมีสีเขียวเข้มออกเงินๆ) เป็นกลุ่มของ coliform bacteria ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สามารถแยก coliform bacteria ได้ จากนั้นนำ culture cells เหล่านี้มาทำการสกัดแยกเอาเมมเบรนออกมาสกัดหา PLFAs ซึ่งสามารถบอกได้จาก profile ของ FAMES ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-FID เปรียบเทียบสาร FAMES มาตรฐาน รูป 4.4.1 และ 4.4.2 ที่แสดงเป็น profile ของ FAMES (หรือ PLFAs) ที่สกัดได้จาก white colony และ dark colony

ขั้นตอนในการศึกษาประกอบด้วย การเก็บตัวอย่างเซลล์ การสกัดแยกกรดไขมันออกจาก PLFAs การเปลี่ยนกรดไขมันให้เป็น FAMES จากลักษณะของ profile ดังรูป 4.4.1 และ 4.4.2 จะมีกรดไขมันหลัก ได้แก่ C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 และ C18:2 ซึ่งมีกรดไขมันที่ไม่มีอิ่มตัว oleic และ linoleic เป็นองค์ประกอบในแบคทีเรียที่ทำการศึกษารูปแบบ PLFAs เหล่านี้ด้วย ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มจากการแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ โดยเป็นกลุ่มแกรมลบสำหรับ dark colony ส่วนกลุ่มที่ไม่ใช่โคลิฟอร์มจะเป็นแกรมบวก เป็น white colony องค์ประกอบของกรดไขมันโดยรวมดูคล้ายคลึงกัน อาจจะเป็นเพราะแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มอยู่ในธรรมชาติเดียวกัน ส่วนรายละเอียดในโครมาโตแกรมที่เวลา 14.10 นาที เป็นสารมาตรฐานหายในที่เดิมลงไป คือ C17:0 นอกจากนี้ที่เวลา 20.00 และ 21.00 นาที พบสองพีคขึ้นคู่กัน ซึ่งทำนายได้ว่าเป็น C22:1 และ C22:0 ตามลำดับ (C20:0 ขึ้นที่เวลา 19.00 นาที)

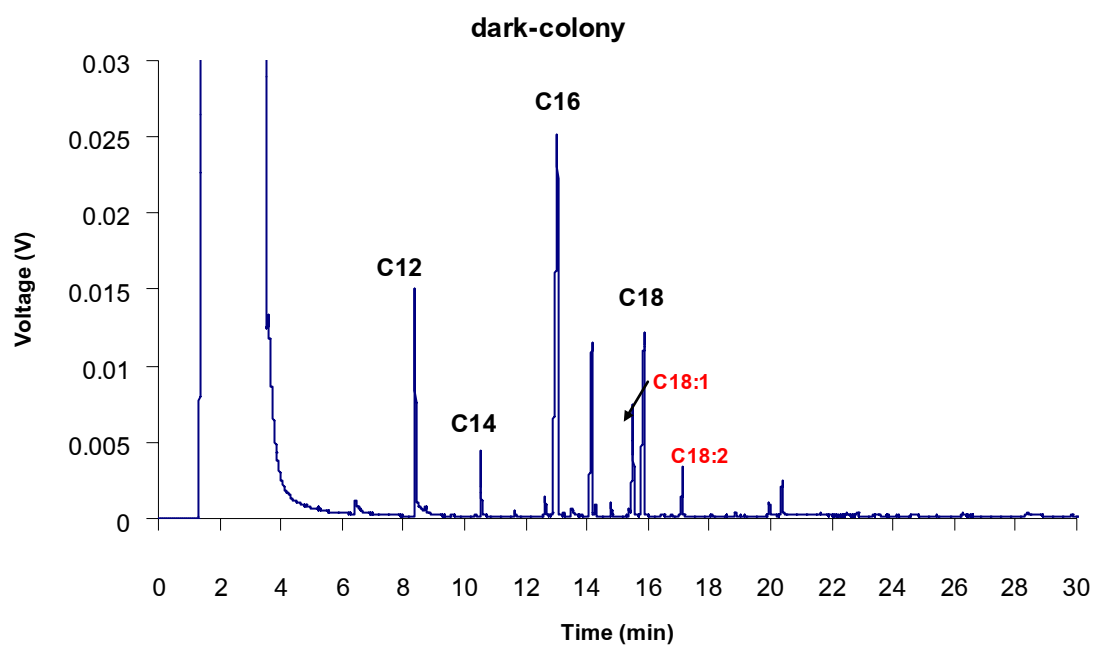


Figure 4.4.1 PLFAs profile of dark-colony (coliform bacteria).

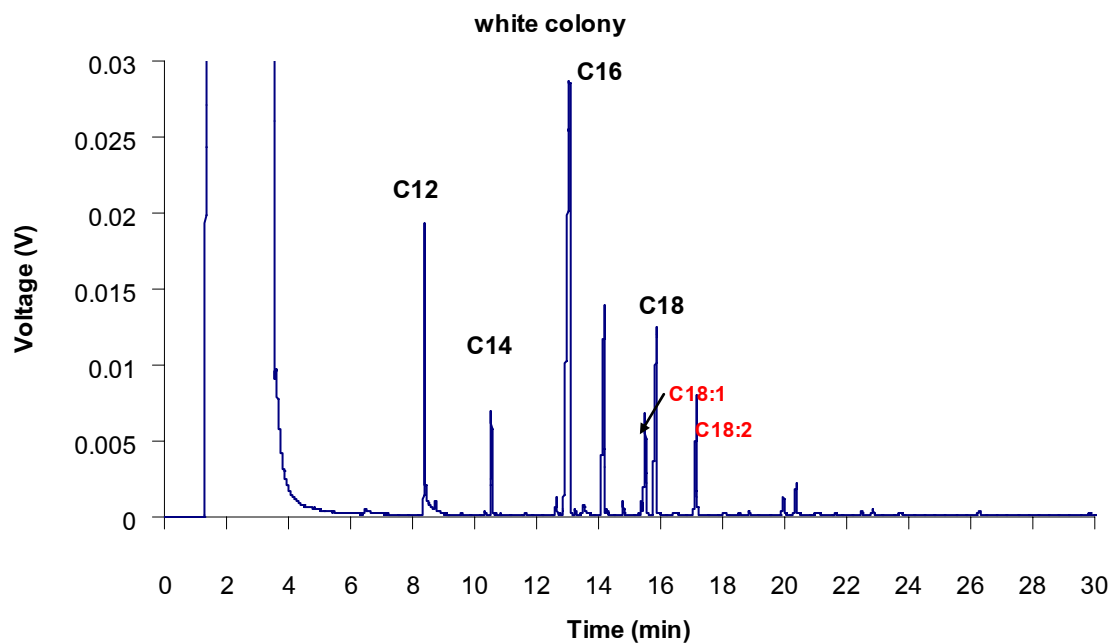


Figure 4.4.2 PLFAs profile of white-colony (non-coliform bacteria).

5. สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถเตรียมอนุพันธ์ fatty acid methyl ester จากกรดไขมันโดยใช้สารละลายกรดในเมทานอลได้ โดยกรดจะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งกรดที่ใช้ศึกษาพบว่า HCl ใช้ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) และ กรด H_2SO_4 ที่ความเข้มข้น 5% (v/v) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ BF_3 ได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งเป็นกรดลิวอิส ตัวแปรที่ควบคุมการเกิดปฏิกิริยา methylation ของเมทานอลที่ได้ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิและเวลาที่เกิดปฏิกิริยา พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในเกิดปฏิกิริยา คือ 50 – 60 °C และใช้เวลา 10 นาทีในการทำปฏิกิริยา สารอนุพันธ์ของ FAMES ที่ได้สามารถวิเคราะห์ได้ดีด้วยเครื่อง GC-FID ให้ผลของการวิเคราะห์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้จากการประเมินความสามารถของเครื่องมือที่ใช้ นอกจากนี้การศึกษากการเตรียม phospholipids fatty acids จากสารมาตรฐานซึ่งใช้เป็นตัวแทนกลุ่มสาร PLFAs จากธรรมชาติ สามารถใช้เทคนิคของการเตรียมตัวอย่างแบบ solid phase extraction (SPE) โดยเก็บส่วนที่ชะ PLFA ได้ด้วยเมทานอล จากนั้นทำการแยกกรดไขมันอิสระออกจาก phospholipids ด้วยเทคนิค saponification แล้วทำการเตรียมอนุพันธ์ของ FAMES ได้ต่อวิธีการที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น

6. เอกสารอ้างอิง

1. Vestal R. J. and White C. D. (1989) Lipid analysis in microbial ecology. *Bioscience*, **39**, 535-541.
2. Seager S. L. and Slabaugh M. R. (2000) Chemistry for today, 4th edition, Academic press, California, USA.
3. Drenovsky R. E., Elliott G. N., Graham K. J. and Scow K. M. (2004) Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, **36**, 1793–1800.
4. Frostegard A., Tunlid A. and Baath E. (1993) Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied Environmental and Microbiology*, **59**, 3605-3617.
5. Virtue P., Nichols P. D. and Boon P. I. (1996) Simultaneous estimation of microbial phospholipid fatty acids and diether lipids by capillary gas chromatography. *Journal of Microbiology Methods*, **25**, 177-185.
6. Rajapaksha R. M. C. P., Tobor-Kaplon M. A. and Baath E. (2004) Metal toxicity affect fungal and bacterial activities in soil differently. *Applied Environmental Microbiology*, **70**, 2966-2973.