อุปกรณ์และวิธีการ

1. สารเคมี

Methanol, AR grade	BDH, England
Chloroform, AR grade	BDH, England
n-Hexane, AR grade	Merck, Germany
Sulfuric acid, AR grade	Merck, Germany
Butylated hydroxytoluene (BHT), AR grade	Sigma, USA
Potassium chloride, AR grade	Merck, Germany
Sodium chloride, AR grade	Merck, Germany
Potassium hydrogen carbonate, AR grade	Fluka, Switzerland
Sodium sulfate anhydrous, AR grade	Merck, Germany
สารมาตรฐานกรดไขมัน PUFA No. 3	Supelco, USA
สารมาตรฐานเปรียบทียบ (reference material)	Supelco, USA
Menhaden oil	
Solidphase extraction (SPE)	Agela Cleanert
แก๊สฮีเลียม	
แก๊สไฮโดรเจน	
แก๊สไนโตรเจน	
Air zreo	

เครื่องมือและอุปกรณ์

Gas Chromatograph	Hewlett Packard รุ่น HP 5890 series II

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

Hot air oven	Yamato, Japan
คอลัมน์กรดไขมัน	Restex

กรวยแยกขนาด 2000 ml, 100 ml

ขวดลดปริมาตร

หลอดลดปริมาตร

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลในเขตพื้นจังหวัดสุราษฎร์ธานี ตั้งแต่เดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ 2553 นำตัวอย่างแช่ในตู้แช่แข็ง เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก Folch, 1959, Brigh and dyer,1957)

นำตัวอย่างฟองน้ำแช่แข็งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง คัดแยกสิ่งปนเปื้อนออก จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก หั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer ใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม:เมทธานอล (2:1) (สัดส่วน10:1 สารละลาย:ตัวอย่าง)

เทสารละลายส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรอง No. 1 เติมสารละลาย 0.88% KCl (1/4 ส่วนของสิ่งสกัด) เขย่าตั้งให้แยกชั้น นำสารละลายส่วนล่างกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ

ทำการลดประมาตรสารที่สกัดโดยชุดระเหย (rotary evapatory) ชั่งน้ำหนักหาปริมาณไขมันรวม (total fat)

วิธีการเตรียมเชื้อจากตัวอย่างฟองน้ำทะเล

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล

1. เก็บตัวอย่างฟองน้ำ โดยนักดำน้ำแบบ scuba diving โดยตัดส่วนของฟองน้ำเก็บใส่ถุงที่ปิดสนิท พร้อมติดกระดาษบันทึกข้อมูล
2. ทำการตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำเพื่อชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 5 กรัมแล้วล้างฟองน้ำเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนออกด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ
3. ทำการบดเนื้อเยื่อฟองน้ำ โดยใส่น้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 5 มิลลิลิตร หรือในอัตราส่วน 1:1 บดจนละเอียด
4. ดูดส่วนที่เป็นน้ำที่ได้จากการบดมา 1 มิลลิลิตร นำมาเจือจางแบบอนุกรมให้ได้ 10-1, 10-2, 10-3 และ10-4 ในน้ำทะเลฆ่าเชื้อ
5. ดูดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10-3 และ 10-4 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell agar แล้วเกลี่ยกระจายบนพื้นหน้าอาหารให้ทั่ว (ทำ 2 ซ้ำ)
6. จากนั้นนำเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 3-5 วัน ตรวจดูผล โดยนับจำนวนโคโลนีทั้ง 2 ซ้ำ
7. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันในแต่ละจานเพาะเชื้อของแต่ละตัวอย่างฟองน้ำ
8. นำโคโลนีที่เลือกมาทำให้บริสุทธ์ (Purification) โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีนั้นลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์เก็บรักษาสายพันธุ์ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell medium ที่มีปริมาณของวุ้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

1. เมื่อได้เชื้อจากตอนที่ 1 แล้วนำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนโดยเขี่ยเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร Modified Zobell medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24ชั่วโมง

2. ถ่ายเชื้อลงในอาหาร Modified Zobell medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

4. ถ่ายเชื้อลงในอาหาร Modified Zobell medium ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่าง 1, 2, 3, 4, 5, 6,7 และ 8 วัน

ขั้นตอนการเก็บเซลล์

1. นำเชื้อที่เลี้ยงไปผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง High Speed Refrigerated Centrifuge ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2. นำส่วนของเซลล์ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl 0.85%)

3.นำเซลล์ที่ได้ชั่งหาน้ำหนัก และนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันต่อไป

อาหารที่ใช้

Modified Zobell medium มีองค์ประกอบดังนี้

Proteose peptone No.3 (DIFCO)	1 กรัม
Yeast extract (MERCK)	1 กรัม
Phytone (BBL)	0.5 กรัม
Sodium thiosulfate	0.2 กรัม
Sodium sulfite	0.05 กรัม
Ferric citrate	1 มิลลิลิตร
น้ำทะเล	900 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.5-7.6

การแยก class ไขมัน (เทคนิค Solid phase extraction; SPE(**http://www.cyberlipid.org/fraction**)

เตรียม Solid phase extraction (SPE column) บรรจุด้วยซิลิกาเจลขนาด 500 mg/6 ml นำตัวอย่างไขมันปริมาณ 1 ml. ใส่ในคอลัมน์จากนั้นชะด้วยคลอโรฟอร์ม10 ml, อะซิโตน:เมทานอล(9:1) 10 ml. และ เมทานอล 15 ml. เพื่อแยก class ของ neutral lipids, glycolipids และ phospholipids ตามลำดับ ทำการลดปริมาตร จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณเป็นร้อยละของไขมันในแต่ละส่วน/ปริมาณไขมันรวม

การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมัน

การศึกษาหาชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างฟองน้ำครั้งนี้วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดไขมันจำนวน 18 ชนิด ได้แก่ C14:0, C16:0, C16:1n7, C16:2n4, C16:3n4, C18:0, C18:1n9, C18:1n7, C18:2n6, C18:3n4, C18:3n3, C18:4n3, C20:1n9, C20:4n6, C20:4n3, C20:5n3, C22:5n3, C22:6n3 ในการ

วิเคราะห์กรดไขมันในตัวอย่างจะเติม Heneicosanoic acid (C17:0) เป็น internal standard เตรียมโดยชั่งสารมา 0.01 กรัม ละลายด้วยเฮกเซน ปรับปริมาตรเป็น 100 มล เวลาใช้งานนำมา 1 มล เติมลงในทุกตัวอย่างในขั้นตอนการทำ methylation

การวิเคราะห์กรดไขมัน (ดัดแปลงจากวิธี Bligh&Dyer, 1959)

นำตัวอย่างไขมัน ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทธานอล 4 มล.

การทำ methylation

-นำตัวอย่างไขมัน 1 มล บรรจุในหลอดทดลองเติมสารละลาย 2% กรดซัลฟูริคในเมทธานอล 10 มล เติม internal standard 1 มล นำไปใส่ตู้อบ 80^{o}C เป็นเวลา 4 ชม. ตั้งทิ้งให้เย็น

-เติม 5 มล 5% โซเดียมคลอไรด์ เติมเฮกเซน 5 มล เขย่าตั้งให้แยกชั้น เก็บชั้นเฮกเซน สกัดซ้ำอีกครั้ง รวมส่วนของเฮกเซนไว้ด้วยกัน

-เติม 40 มล 2% โปตัสเซียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เขย่าล้างตั้งให้แยกชั้น เก็บส่วนของ เฮกเซน (ชั้นบน) กรองผ่านโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ นำสารที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยชุดระเหยและแก๊สไนโตรเจน

-เติมเฮกเซน 1 มล ลงในสิ่งสกัด นำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ

การแยกและการตรวจวัด

สำหรับการวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันในตัวอย่างฟองน้ำ ใช้การเปรียบเทียบเวลาที่พีคของสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์เทียบกับเวลาของสารมาตรฐานซึ่งทราบแล้วว่าแต่ละพีคเป็นสารมาตรฐานชนิดใด ส่วนการหาปริมาณของกรดไขมัน ทำโดยใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างกับพื้นที่ทั้งหมดการคำนวณ %กรดไขมันตามสูตร

%กรดไขมัน = 100 x พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมัน / A

A= **พื้นที่ใต้พีคกรดไขมันทั้งหมด** – (**พื้นที่ใต้พีคเฮกเซน+พื้นที่ใต้พีค BHT + พื้นที่ใต้พีค internal standard**)

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Hewlett Packard 5890 series II)

คอลัมน์	Famewax,
	ขนาด 30 m. x 0.25 mm. x 0.25 μm. (length x id x film thickness)
แก๊สเคลื่อนที่	แก๊สฮีเลียม อัตราการไหล 1.3 มล/นาที
อุณหภูมิเตาอบ	120 ^{o} C 0.5 min
	120^{o} C ⟶ 195^{o} C (5 min, 18^{o} C/min)

	195° C ⟶ 205° C (7 min, 3° C/min)
	205° C ⟶ 220° C (10 min, 8° C/min)
อุณหภูมิช่องฉีดสาร	250° C
อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด	250° C
เครื่องตรวจวัด	ชนิด Flame Ionizertion Detecter (FID)
ชนิดการฉีด	split 10:1
ปริมาตรที่ฉีด	1 µl

การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์กรดไขมัน

ทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดไขมันของสารมาตรฐานเปรียบเทียบ (Reference material) PUFA No.3 จาก Menhaden oil ตามขบวนการที่วิเคราะห์สารตัวอย่างได้ผลแสดงดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 4 Quality control data of fatty acid from Menhaden oil (n=3)

Fatty acid	Area Percent (%) reference material	Area Percent (%) from this study	% recovery
Myristic, C14:0	8.2	7.71	94.02
Palmitic, C16:0	15.4	15.53	100.84
Stearic, C18:0	2.8	2.96	105.71
Oleic, C18:1	6.8	7.19	105.73
Stearidonic, C18:4n3	3.8	3.71	97.63
EPA, C20:5n3	15.9	15.7	98.74
7,10,13,16,19-docosapentaenoic, C22:5n3	2.3	2.21	96.09
DHA, C22:6n3	10.7	10.87	101.59