

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา⁽¹⁾

ธาตุเหล็ก(Fe) เป็นหนึ่งในโลหะทรานซิชันของแถวแรก มีลักษณะการจัดเรียงตัวของอิเล็กตรอนเป็นแบบ $3d^6, 4s^2$ พบมากเป็นอันดับที่ 4 ของธาตุทั้งหมด โดยเฉพาะบนพื้นผิวโลก และยังมีค่า oxidation state เปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง -2 ถึง +6 แต่ oxidation state ของเหล็กที่มีค่า +2 และ +3 เท่านั้นที่มีบทบาทสำคัญ และจำเป็นต่อระบบชีวภาพ ซึ่งค่า oxidation state ทั้งสองนี้มีความไวต่อความเป็นกรด-เบส และผลของการรวมกันเป็นสารเชิงซ้อน และเนื่องจากธาตุเหล็กเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญและมีความจำเป็นต่อกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์ต่างๆ นอกเหนือจากนั้นค่า oxidation state ของเหล็กที่อยู่ในรูปไอออนเฟอร์รัส(ferrous, Fe^{2+})และ ไอออนเฟอร์ริก (ferric, Fe^{3+}) ยังเป็นตัวช่วยส่งเสริมให้ธาตุเหล็ก มีความสามารถในการเกิดอันตรกิริยา ของการถ่ายเทอิเล็กตรอน โดยทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวขนส่งอิเล็กตรอน (electron transporter)นั่นเอง

เนื่องจากธาตุเหล็กเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียหรือรา ดังนั้นหากจุลินทรีย์เหล่านี้ขาดธาตุเหล็กหรือมีน้อยมากแล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างกลไกพิเศษขึ้นมาเพื่อจับกับเหล็ก และนำธาตุเหล็กมาใช้ ดังนั้นมันจึงจำเป็นต้องผลิตสารเคมีขึ้นมาซึ่งมีชื่อเรียกว่า ไสเดอโรฟอร์ (siderophores) ที่มีลักษณะทางเคมีแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ ปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมที่อยู่ภายนอกเพื่อจับกับเหล็กแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซด์โรฟอร์ สารนี้จะถูกส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์เหล่านั้น และนำเหล็กที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป ดังนั้นไซด์โรฟอร์ที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการนี้ถือได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติตัวหนึ่ง ที่สามารถนำมาพัฒนาทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้ โดยเฉพาะในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเทคโนโลยีทางด้านนี้ปัจจุบันกำลังเป็นที่สนใจศึกษาและนำไปประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวาง ด้วยเหตุผลที่ว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้นั้นส่วนใหญ่จะไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็ว และได้ทั้งจำนวนและปริมาณมากอีกด้วย ถ้าหากมีการศึกษาและพัฒนากันอย่างมีประสิทธิภาพและจริงจัง

จากการศึกษาวิจัย พบว่าไซด์โรฟอร์มีความสามารถในการจับตัวกับเหล็กได้เป็นอย่างดี

แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของไฮเดรโอโรฟอร์ว่าเป็นประเภทใด เช่น กลุ่มไฮดรอกซามาต (hydroxamate) หรือ กลุ่มแคทีโกล (catecholate) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้ มีความเสถียรสูงและละลายน้ำได้ดี ดังนั้นงานวิจัยโครงการนี้จึงได้นำสมบัติเหล่านี้มาศึกษาและพัฒนาระบบการวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็กจากการใช้ไฮเดรโอโรฟอร์ที่แยกและทำให้บริสุทธิ์แล้ว

ซึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็กนั้น ปัจจุบันสามารถศึกษาได้หลายวิธี ได้แก่

- วิธีเคมีดั้งเดิม (classical methods) เช่น Gravimetric method และ Volumetric method เป็นต้น

- วิธีการใช้เครื่องมือ (Instrumental methods) เช่น Atomic Absorption Spectrometer เครื่อง Inductive Coupled Plasma และเครื่อง Spectrophotometer เป็นต้น

การหาปริมาณของเหล็กโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometric method) ด้วยเครื่อง spectrophotometer นั้น อาศัยหลักการของการดูดกลืนคลื่นแสงของสาร โดยเหล็กจะรวมตัวกับสารเคมีแล้วได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี และดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ กัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมี สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ 1,10-phenanthroline , 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline , 2,2-bipyridine , 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine , phenyl 2-pyridyl ketoxime , ferrozine , thiocyanate เป็นต้น

ข้อดีของวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีที่เหนือกว่าวิธีเคมีดั้งเดิมก็คือ ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง สะดวกสบาย สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีจำนวนมากได้รวดเร็ว วิเคราะห์เหล็กที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ ถึงแม้ว่าเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะมีราคาแพง และต้องอาศัยการเรียนรู้การใช้งานบ้างพอสมควรก็ตาม แต่ก็ให้ข้อดีดังได้กล่าวข้างต้น

สารเคมีที่ได้กล่าวข้างต้น บางชนิดมีข้อด้อย เช่นมีความเสถียรต่ำ สลายตัวง่ายในช่วง pH แคบๆ บางชนิดมีราคาก่อนข้างแพง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำไฮเดรโอโรฟอร์มาศึกษาหา ปริมาณของเหล็กแทน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พยายามพัฒนาปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็กด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาประยุกต์ เพื่อเพิ่มศักยภาพและขยายขอบเขตในการศึกษาให้มากยิ่งขึ้น จึงได้เลือกเอาสารเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอย่าง

ไฮเดรโอโรฟอร์ มาเป็นทางเลือกตัวใหม่ทางหนึ่งของการพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อทดแทนหรือเพิ่มวิถีทางในการวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็กในอนาคต ซึ่งต้องอาศัยเทคนิค

ทางสเปกโทรโฟโตเมทรี ที่เป็นวิธีการและกระบวนการทางด้านวิทยาศาสตร์ในการศึกษา โดยการ
ใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ร่วมในการทดลองศึกษา การศึกษาโครงการวิจัยนี้ยังเป็นการสนับสนุน
และส่งเสริมงานวิจัยทั้งทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานและวิทยาศาสตร์ประยุกต์ไปพร้อมๆ กัน

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีแยกไซเดอโรฟอร์ และทำให้บริสุทธิ์
2. เพื่อศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อไซเดอโรฟอร์บริสุทธิ์
3. เพื่อศึกษาประเภทของไซเดอโรฟอร์ชนิดต่างๆ
4. เพื่อผลิตไซเดอโรฟอร์สำหรับหาปริมาณของเหล็ก โดยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 นำไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตโดย *Ps. aeruginosa* จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาศึกษาการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ ไซเดอโรฟอร์และสารประกอบเชิง
ซ้อนของเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ โดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น adsorption chromatography, gel filtration
chromatography และอื่นๆ พร้อมศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ด้วย
กระบวนการทางเคมี

3.2 ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อ λ_{max} ของไซเดอโรฟอร์ เช่น แสง อุณหภูมิ และ pH
เป็นต้น

3.3 ศึกษาประเภทของไซเดอโรฟอร์ โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น Arnow test และ Berg &
Becker test เป็นต้น

3.4 ศึกษาช่วงของกราฟมาตรฐานของเหล็ก(III)กับไซเดอโรฟอร์ ภายใต้สภาวะที่
เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่น วิธี 1,10-phenanthroline เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

4. ขอบเขตและข้อจำกัดของการศึกษา

4.1 ผลิตไซเดอโรฟอร์จาก *Ps. aeruginosa* พร้อมทั้งเพิ่มปริมาณให้มาก เพื่อนำไปศึกษา
ขั้นต่อไป

4.2 แยกและทำให้ไซเดอโรฟอร์ และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์
บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทางเคมี เช่น เทคนิคทางโครมาโทกราฟี

- 4.3 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาระหว่าง เหล็ก(III) กับไฮเดรโอโรฟอร์
- 4.4 ศึกษาหาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อไฮเดรโอโรฟอร์ และสารประกอบเชิงซ้อนของ เหล็ก-ไฮเดรโอโรฟอร์ เช่น ผลของอุณหภูมิ แสง pH ที่มีต่อการดูดกลืนแสง
- 4.5 ศึกษาประเภทของไฮเดรโอโรฟอร์ต่างๆ ด้วยวิธี Csaky, Triphenyltetrazolium chloride, Berg & Becker และ Arnow
- 4.6 สรุปผลการทดลองได้ว่า ไฮเดรโอโรฟอร์บริสุทธิ์ชนิดนี้ เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ สำหรับหาปริมาณของเหล็กได้หรือไม่

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 5.1 ได้รู้จักวิธีการผลิตไฮเดรโอโรฟอร์
- 5.2 ทำให้ทราบเทคนิคที่เหมาะสมในการแยก และทำให้ไฮเดรโอโรฟอร์บริสุทธิ์
- 5.3 ทำให้ทราบถึงปัจจัยบางประการที่มีผลต่อ λ_{max} ของไฮเดรโอโรฟอร์ และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไฮเดรโอโรฟอร์
- 5.4 ทราบประเภทของไฮเดรโอโรฟอร์ได้จากการทดสอบด้วยปฏิกิริยาเคมี
- 5.5 คาดว่าจะได้สารชนิดใหม่ที่ใช้ในการหาปริมาณของเหล็ก โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี
- 5.6 นำไฮเดรโอโรฟอร์ที่บริสุทธิ์ไปใช้ประโยชน์ในการหาปริมาณของเหล็ก รวมทั้งสามารถนำเทคนิคที่ได้ไปใช้ผลิตไฮเดรโอโรฟอร์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป