บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 ที่มาของสารฟีนาซีน

ในงานวิจัยนี้เป็นการผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารฟีนาซีนที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น Pyocyanin (PYO), Phenazine-1-carboxamide (PCN), Phenazine-1-carboxylic acid (PCA) เป็นต้น แต่ในทางการแพทย์กลับพบว่าแบคทีเรีย *P. aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อโรคในคนซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล ทำให้เกิดโรคได้ในทุกระบบของร่างกาย เช่น เยื่อบุหัวใจอักเสบ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อที่ผิวหนังโดยเฉพาะแผลไฟไหม้ หรืออาจทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังจากการใช้สระว่ายน้ำเครื่องอบตัว ร่วมกัน หรือการติดเชื้อที่ตาในคนที่ใส่คอนแทคเลนส์ เป็นต้น (พอใจ เรืองศรี และคณะ; พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ และคณะ)

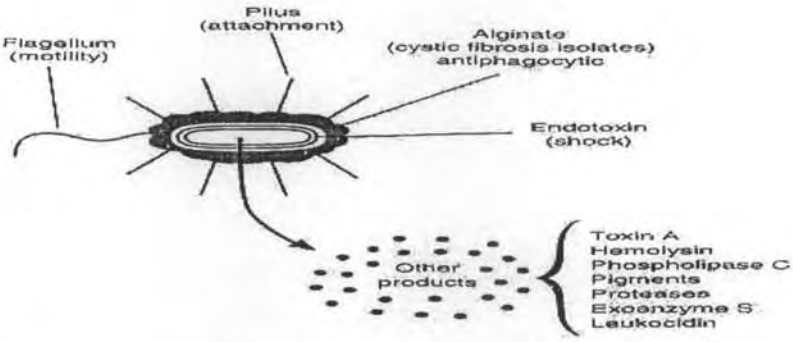
2.1.1 ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไปของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

แบคทีเรีย *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 0.5 – 0.8 μm หรือ 1.5 – 3.0 μm มีกลิ่นเฉพาะคล้ายกลิ่นองุ่น เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ขั้วเซลล์ สร้างออกซิเดสและใช้กลูโคสได้ โคโลนีมีหลายแบบอาจเป็นโคโลนีเรียบหยาบหรือเป็นเมือกใสคล้ายหยดน้ำ และมีความหนืดมาก โคโลนีมักจะแผ่ไปตามรอยขีด (streak) คุณสมบัติที่สำคัญที่ใช้แยกเชื้อ *P. aeruginosa* ออกจากเชื้ออื่นๆได้คือ เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวที่สร้างสาร Pyocyanin ได้ สารสีนี้ละลายได้ในน้ำและคลอโรฟอร์ม มีสีเขียวปนน้ำเงิน ไม่เรืองแสง ซึ่งสังเกตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตาม *P. aeruginosa* สามารถสร้างสารสีอื่น ๆ ได้อีก เช่น Pyoverdins มีสีเหลือง, Pyorubin มีสีแดง และ Pyomelanin มีสีน้ำตาล เป็นต้น

แบคทีเรีย *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน โดยสร้างพลังงานจากการออกซิเดชัน มากกว่าการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อสามารถเจริญได้ในระบบที่มีเพียงอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรีย *P. aeruginosa* สามารถเจริญเติบโตได้แม้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนโดยอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25 – 37 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญเติบโตช้าหรืออยู่ไม่ได้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงหรือต่ำจนเกินไป

แบคทีเรีย *P. aeruginosa* มักดำรงชีวิตแบบอิสระในดิน น้ำ และผัก หรืออาจพบในผิวหนังของคนปกติ นอกจากนี้ยังพบได้ในคอ (5%) และอุจจาระ (3%) ในคนปกติ และพบว่ามีบทบาท

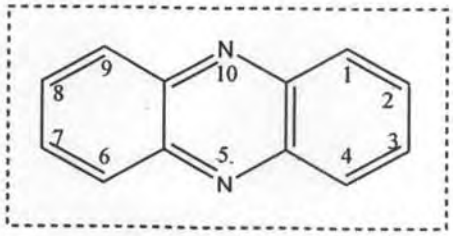
สำคัญในด้านการย่อยสลายชีวะโมเลกุล วัฏจักรของคาร์บอนและไนโตรเจน สามารถทนต่อสภาพที่มีเกลือเข้มข้น และยาปฏิชีวนะได้ ภาพตัวอย่างของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 2.1 (พอใจ เรืองศรี และคณะ)



รูปที่ 2.1 ภาพตัวอย่างของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

2.2 โครงสร้างและลักษณะทางเคมีของสารฟีนาซีน

สารฟีนาซีน เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compound) ที่มีไนโตรเจนอะตอมอยู่ในโมเลกุล และยังเป็นสารประเภทรีดอกซ์ไซคลิก (redox cyclic) ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อย่างอัตโนมัติ (autooxidation) นอกจากนั้นยังมีลักษณะพิเศษที่สามารถเกิดการถ่ายโอนประจุได้ดี (Pierson III and Pierson, 1996) เนื่องจากในโครงสร้างหลักของสารฟีนาซีนนั้นมีไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว ดังรูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างหลักของสารฟีนาซีน

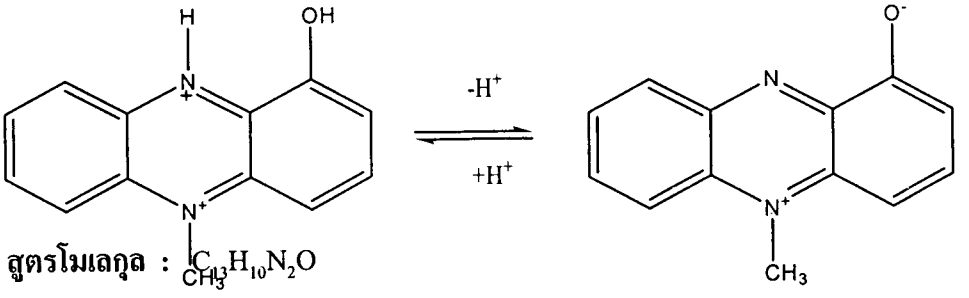


รูปที่ 2.2 โครงสร้างหลักของสารฟีนาซีน (Ohfuji et al., 2004)

ปัจจุบันพบว่ามีสารฟีนาซีนมากกว่า 6,000 ชนิด ซึ่งเกิดจากการแทนที่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันด้วยหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันบนโครงสร้างหลักของสารฟีนาซีน ซึ่งการแทนที่ด้วยหมู่แตกต่างกันและตำแหน่งแตกต่างกันนั้น ทำให้ได้สารฟีนาซีนหลายชนิดมีสมบัติแตกต่างกันออกไป (Laursen and Nielsen, 2004) โดยสารฟีนาซีนที่พบทั่วไป ได้แก่ Pyocyanin จะมีสีน้ำเงิน ส่วนสาร Phenazine-1-carboxylic acid (PCA) และสาร Phenazine-1-carboxamide (PCN) และ1-hydroxy

phenazine นั้นมีสีเหลือง เป็นต้น (Watson et al., 1986)โครงสร้างและสมบัติทางเคมีที่สำคัญของสารฟีนาซีนที่พบทั่วไป มีดังนี้

2.2.1 Pyocyanin (PYO)



สูตรโมเลกุล : $C_{13}H_{10}N_2O$

น้ำหนักโมเลกุล : 210.230

ลักษณะทางกายภาพ : ผลึกรูปเข็มสีน้ำเงิน

จุดหลอมเหลว : 133 องศาเซลเซียส (ทั้งนี้จุดหลอมเหลวอาจไม่แน่นอนเพราะอาจเกิดการสลายตัวก่อน)

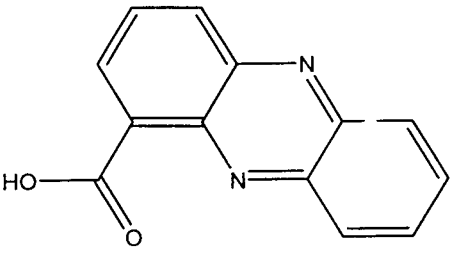
สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุด : 238 242 278 315 และ 368 นาโนเมตร

การละลาย : Pyocyanin สามารถละลายได้ในน้ำ เบนซีน เอทานอล คลอโรฟอร์ม แต่จะไม่ละลายใน Petroleum ether

คุณสมบัติอื่น ๆ ได้แก่

- สีของ Pyocyanin สามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับ pH โดยที่ pH เท่ากับ 3 – 4 จะมีสีแดง pH เท่ากับ 5 – 6 จะมีสีม่วง และ pH มากกว่า 7 จะมีสีน้ำเงิน
- สีของ Pyocyanin ที่ได้ ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ และยังพบว่า การเติมกลีเซอรอลในอาหารเหลวจะทำให้ได้สีของ Pyocyanin ที่เหมาะสม
- ในสภาวะที่ขาดออกซิเจน *P. aeruginosa* จะไม่สามารถผลิต Pyocyanin ได้
- เมื่ออยู่ในสารละลายเบส Pyocyanin จะเปลี่ยนเป็นสารละลาย สีเหลือง คือ Hemipyocyanin หรือ อาจเรียกว่า 1-hydroxyphenazine

2.2.2 Phenazine-1-carboxylic acid (PCA)



สูตรโมเลกุล : $C_{13}H_8N_2O_2$

น้ำหนักโมเลกุล : 224.1

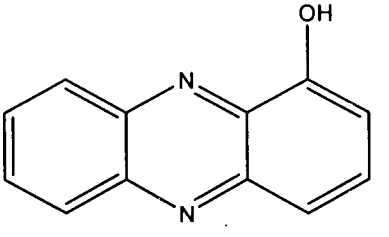
ลักษณะทางกายภาพ : ผลึกสีเหลือง

จุดหลอมเหลว : 237 – 240 องศาเซลเซียส

สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุด : 251 369 นาโนเมตร

คุณสมบัติอื่น ๆ : PCA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ได้ โดยที่สมบัติทางปฏิชีวนะของสาร PCA จะลดลง เมื่อ pH มากกว่า 7

2.2.3 1-Hydroxyphenazine



สูตรโมเลกุล : $C_{12}H_8N_2O$

น้ำหนักโมเลกุล : 196.20

ลักษณะทางกายภาพ : ผลึกสีเหลือง

จุดหลอมเหลว : 157 – 158 องศาเซลเซียส

สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุด : 238 264 274 360 และ 383 นาโนเมตร

คุณสมบัติอื่น ๆ : เราสามารถเตรียม 1-Hydroxyphenazine ได้จากการเติมสารละลายเบสมากเกินพอให้กับ Pyocyanin

2.3 ความสำคัญของสารฟีนาซีน

สารฟีนาซีนเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonas, Streptomyces* รวมทั้งแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินและในทะเล โดยสารฟีนาซีนและอนุพันธ์ของสารฟีนาซีนมีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง สารต้านมาลาเลีย และสารต้านปรสิต ซึ่งสารฟีนาซีนสามารถดูดกลืนแสง UV-A และ UV-B ได้ดี (Fernández and Pizarro, 1999) เกิดฟลูออเรสเซนซ์ได้ต่ำมากแต่สามารถเกิดฟอสฟอเรสเซนซ์ได้สูงมาก นั่นแสดงว่าในสถานะกระตุ้นสารฟีนาซีนสามารถเกิด intersystem crossing ได้ดีกว่าการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ (Choudhury and Basu, 2003) และจากโครงสร้างสารฟีนาซีนที่เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compound) ที่มีไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลเป็นสารประกอบรีดอกซ์ไซคลิก (redox cyclic) สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเองได้อย่างอัตโนมัติและเนื่องจากสารฟีนาซีนมีไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลที่มีอิเลกตรอนคู่โดดเดี่ยว ทำให้มีลักษณะพิเศษสามารถเกิดการถ่ายโอนประจุได้ดี จากคุณสมบัติและลักษณะของสารฟีนาซีนที่สำคัญข้างต้น ทำให้สามารถประยุกต์ใช้สารฟีนาซีนเพื่อให้เกิดประโยชน์ได้ ดังนี้

ด้านการเกษตร จากการที่สารฟีนาซีน มีสมบัติเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้สารฟีนาซีนสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช เช่น สามารถลดการเกิดโรค Take-all ในรากข้าวสาลีอันเป็นสาเหตุมาจากเชื้อ *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* และสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคพืชชนิดอื่นๆ ได้เช่นเดียวกัน (Pierson III and Pierson, 1996)

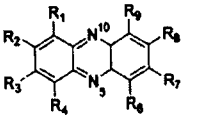
ด้านการแพทย์ สารฟีนาซีนบางชนิดมีสมบัติในการเป็นยาต้านมะเร็งได้ แต่อย่างไรก็ตามสารอนุพันธุ์ของฟีนาซีนประเภทนี้มักมีโครงสร้างทางเคมีที่ค่อนข้างซับซ้อน (Lee et al., 2004) สาร Pyocyanin และ สาร 1-hydroxyphenazine มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิด *Candida albicans* และ *Aspergillus fumigatus* ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค pulmonary candidiasis ในคน (Kerr et al., 1999) และนอกจากนั้นสาร Pyocyanin ยังถูกนำไปใช้ในกระบวนการทางเภสัชกรรมในการต้าน nitic oxide (NO) (Reszka et al., 2004)

ด้านอุตสาหกรรม เนื่องจากสารฟีนาซีนมีสมบัติเป็นสารที่สามารถเกิดการรีดอกซ์ได้ง่าย จึงนำไปประยุกต์ใช้ทาง Bioelectronic และ Biosensors โดยเป็นสารตัวกลาง (Mediator) ในระบบ Glucose sensors ได้ (Ohfuji et al., 2004) มีการนำสาร Pyocyanin ไปใช้ลดการเสื่อมสภาพของน้ำมันดิบที่มีผลกระทบจากแบคทีเรีย (Sean Norman et al., 2004) นอกจากนั้น สารฟีนาซีนยังถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในแผงวงจรเซลล์สุริยะ (Solar cell) (Jana, 2000) และใช้ในการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าในงานวิจัยด้านเคมีไฟฟ้า (Puskás and Inzel, 2005)

2.4 การผลิตสารอนุพันธ์ของฟีนาซีน

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนนั้น พบว่า การเติมสารควบคุมอัตโนมัติ (autoregulator) เช่น L-*N* (3-oxohexanoyl) homoserine lactone (HSL) ลงไป จะมีผลทำให้การผลิตสารฟีนาซีนเพิ่มขึ้น รวมทั้งสารที่เกิดจากเมทาบอไลท์ทุติยภูมิชนิดอื่นๆ ด้วย (Stead et al., 1996) แต่หากมีสารประเภท *P*-aminobenzoate อยู่ด้วย กลับลดการผลิตสารไพโอไซยานินให้น้อยลง แต่กลับเพิ่มการผลิตสาร PCA และสาร Oxychlororamphin (Byng et al., 1979) ตัวอย่างสารอนุพันธุ์ของฟีนาซีนอย่างง่ายที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. และ *Streptomyces* spp. แสดงดังตารางที่ 2.1 และตารางที่ 2.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.1 สารอนุพันธุ์ของฟีนาซีนอย่างง่ายที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Pseudom*onas spp. (Laursen and Nielsen, 2004)

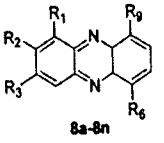


1a-1u

compd	R_1	R_2	R_3	R_4	R_6	R_7	R_8	R_9	trivial name
1a	OH								hemipyocyanin
1b		OH							
1c	OH				OH				
1d	OH						OH		
1e		OH	OH						
1f		OH	OH			OH			
1g	OH						NH_2		
1h	COOH								tubermycin B
1i	COOH	OH							
1j	COOH			OH					
1k	COOH				OH				
1l	COOH							OH	
1m	COOH	OH	OH						
1n	COOH	OH			OH				
1o	COOH	OH						OH	
1p	COOH	OH	OH	OH					
1q	COOH				COOH				
1r	COOH	OH	OH		COOH	OH			
1s	$COOCH_3$				$COOCH_3$				
1t	$COOCH_3$			OH	$COOCH_3$				
1u	$COOCH_3$			OH	$COOCH_3$			OH	

สารฟีนาซีน นอกจากจะผลิตได้จากแบคทีเรียแล้ว ยังสามารถเตรียมได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่เนื่องจากข้อจำกัด เรื่องการควบคุมตำแหน่งการแทนที่และการที่เคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนภายในโครงสร้างหลักของสารฟีนาซีนนั้น จึงทำให้ยังไม่มีวิธีการสังเคราะห์วิธีใดๆ ที่มีประสิทธิภาพดีพอในการยอมรับของวิธีการสังเคราะห์ ที่มีหลายวิธีภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน (Laursen and Nielsen, 2004)

ตารางที่ 2.2 แสดงสารอนุพันธ์ของฟีนาซีน อย่างง่ายที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. (Laursen and Nielsen, 2004)



8a-8n

compd	R_1	R_2	R_3	R_6	R_9	trivial name
8a	OH			OH		hemipyocyanin
8b	OH			OCH_3		
8c	OH			OCH_3		
8d	OCH_3			OCH_3		
8e	OCH_3			OCH_3		mycomethoxin A
8f	OCH_3	OCH_3	OH	OH		phenacein
8g	COOH			CH_2OH		mycomethoxin B
8h	COOH			CH_2OH	OH	
8i	COOH			CH_3	OCH_3	
8j	COOH			$COOCH_3$		phencomycin
8k	COOH			$COOCH_3$		SB 212021
8l	COOH	OH				
8m	$COOCH_3$			OCH_3		
8n	$COOCH_3$					

แบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. หลายสายพันธุ์ สามารถผลิตสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยงที่แตกต่างกัน ซึ่งมีอยู่มากมายหลายชนิด สามารถพิจารณาได้จากตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. และอาหารที่ใช้เลี้ยงในการผลิตสารอนุพันธ์ของฟีนาซีน

สายพันธุ์แบคทีเรีย	อาหารที่ใช้เลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
P. aeruginosa	- Mineral salt medium	Kanner et al., 1978
	- King's A medium *	Fernándaz and Pizarro, 1997
	- Modified of King's A medium*	Byng et al., 1979
	- Luria-Bertani medium (LB)	Audenaert et al., 2002
	- TYS broth	Hassett et al., 1992
	- Ingram and Blackwood broth I, II, III *	Ohfuji et al., 2004
	- Ethanol broth	Ohfuji et al., 2004
P. fluorescens	- Luria-Bertani medium (LB)	Huang et al., 2004
	- M9 medium *	Huang et al., 2004
P. aureofaciens	- King's B medium *	Chancey et al., 1999
	- Pigment production medium (PPMD)*	Chancey et al., 1999
	- Luria-Bertani medium (LB)	Whistler et al., 2003
	- M9 minimal medium*	Whistler et al., 2003

หมายเหตุ: *เป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้เลี้ยง และสามารถผลิตสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนได้เป็นอย่างดี

เนื่องจากการที่สารฟีนาซีนมีสมบัติเป็นสารรีดอกซ์ไซคลิก จึงสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจนได้ ทำให้เกิดสารซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ (hydrogen peroxide) ขึ้นได้ ภายใต้สภาวะที่มีโลหะเป็นตัวเร่ง เช่น เหล็ก ต่อมาสารเหล่านั้นเปลี่ยนไปเป็นไฮดรอกไซด์แรดิคัล (hydroxide radical, $OH^{\cdot}$) โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารฟีนาซีนกับโมเลกุลของออกซิเจนเช่นนี้ จึงเป็นสาเหตุของการเกิดอนุพันธ์ของออกซิเจนที่เป็นพิษขึ้น ทำให้เซลล์สิ่งมีชีวิตตายได้ ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่ว่า ทำไมสารฟีนาซีนจึงสามารถใช้เป็นสารปฏิชีวนะ ปฏิกิริยาที่เกิดสารพิษเช่นนี้ยังสามารถเกิดในเซลล์ของมนุษย์และเป็นพิษต่อมนุษย์ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นการติดเชื้อหรือการได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าไป จะก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของผนังเซลล์ เช่น การงอกขยายของเนื้อเยื่อชั้นผิว และยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวได้อีกด้วย (Hassett et al., 1992)

2.5 การตรวจสอบสารฟีนาซีน

การตรวจสอบสารฟีนาซีนนั้นมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตออกมา รวมทั้งชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงและผลิตภัณฑ์ของสารฟีนาซีนที่สนใจ วิธีที่นิยมใช้ทั่วไปในการวิเคราะห์และหาปริมาณของสารฟีนาซีนนั้นมีหลายวิธี เช่นอาศัยวิธีการดูดกลืนแสง โดยใช้เทคนิคอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (Mavrodi et al., 2004) ส่วนการตรวจสอบความบริสุทธิ์สามารถตรวจได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Fernándaz and Pizarro, 1997) แต่ก่อนตรวจวัด มักใช้วิธีการสกัดสารฟีนาซีนด้วยการสกัดแบบของเหลว-ของเหลวก่อน ตัวอย่างเช่น

หลังเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aureofaciens* ในอาหารเหลวสูตร PPMD จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว มาปรับ pH เท่ากับ 2 ด้วยกรด HCl สกัดสารฟีนาซีนด้วยเบนซีน ซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายในชั้นของเบนซีนที่ได้มารวมกัน แล้วนำไประเหยแห้ง นำสารที่ได้ละลายในสารละลาย 0.1 N NaOH ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวิสิเบิล-อัลตราไวโอเล็ต สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 367 นาโนเมตร (Whistler and Pierson III, 2003)

หรือหลังเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในอาหารเหลวสูตร Pseudomonas P ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงแยก เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นของเหลวออก สกัดสารฟีนาซีนด้วยคลอโรฟอร์ม ซ้ำ 2 ครั้ง นำชั้นของคลอโรฟอร์ม ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวิสิเบิล-อัลตราไวโอเล็ต สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 367 นาโนเมตร (Audenaert et al., 2002)

2.6 เทคนิคการแยกสารฟีนาซีน

สำหรับการแยกสารฟีนาซีนนั้นเทคนิคการแยกที่นำมาใช้คือ เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกอีกแบบหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้แล้วยังสามารถใช้เป็นเทคนิคที่ใช้ในการทำให้สารละลายมีความเข้มข้นขึ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ คุณภาพวิเคราะห์และการแสดงเอกลักษณ์ (identification) ได้อีกด้วย กรรมวิธีในการทำโครมาโทกราฟี คือ การทำให้ส่วนผสมของสารตัวอย่างแยกตัวออกจากกันเป็นโซน หรือ แบ่งเป็นตอน ๆ ซึ่งเกิดขึ้นได้จากการกระจายของสารระหว่างเฟสสองเฟส คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase; mp) กับเฟสอยู่นิ่ง (stationary phase; sp) การเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารผสมแยกออกจากกันเป็นแถบ เป็นตอนๆ หรือเป็นโซนได้ กระบวนการที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่แยกออกจากกันได้ โดยมีตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ได้เป็นตัวพา เรียกว่า อีลูชัน (elution) หรือการอีลูท ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวพาตัวถูกละลายนั้น เรียกว่า สารอีลูเอนท์ (eluent) ตัวถูกละลายซึ่งถูกชะจะเรียกว่า สารชะ (eluate) ซึ่งเทคนิคทางโครมาโทกราฟีมีหลายชนิดดังนั้นจะขออธิบายเฉพาะเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย มีดังนี้

2.6.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption Chromatography)

โครมาโทกราฟีชนิดนี้ เป็นเทคนิคที่ใช้มานานกว่าเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดอื่น โดยใช้ของแข็งเป็นเฟสอยู่นิ่ง และของเหลวเป็นเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า โครมาโทกราฟีแบบของเหลว – ของแข็ง (Liquid-Solid Chromatography; LSC)

หลักการแยกสาร คือ สารต่างๆ จะเคลื่อนที่ต่างกันบนเฟสอยู่นิ่งหรือตัวดูดซับ (adsorbent) ซึ่งบรรจุอยู่อย่างเป็นระเบียบอยู่ในคอลัมน์แก้ว ในขณะที่มีเฟสเคลื่อนที่หรือตัวชะ (eluent, solvent) เคลื่อนที่ผ่านลงมา สารใดที่มีแรงยึดเหนี่ยวกับตัวดูดซับมาก และละลายได้น้อยในตัวชะก็จะเคลื่อนที่ได้ช้า ในขณะที่สารที่มีแรงยึดเหนี่ยวกับตัวดูดซับน้อย แต่ละลายได้ดีในตัวชะ ก็จะเคลื่อนที่ลงมาเร็วกว่า

ตัวดูดซับหรือเฟสอยู่นิ่ง ตัวดูดซับที่ดีต้องมีความสามารถในการดูดซับสารไว้ที่พื้นผิวได้ต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของพื้นผิว ซึ่งจะอุ้มสารไว้ด้วยแรงต่าง ๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน (H-bond) แรงไฟฟ้าสถิตแรงยึดเหนี่ยวเนื่องจากมีค่าอิเล็กโทรเนกาติวิตีต่างกันอื่นๆ ที่นอกจากพันธะไฮโดรเจนและแรงยึดเหนี่ยวระหว่างมวล ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ทำให้แยกสารได้ต่างกันในตัวดูดซับที่ต่างกัน ตัวดูดซับนี้อาจแบ่งออกได้ตามค่าความแรงของการดูดซับ เช่น ตัวดูดซับที่มีความสามารถในการดูดซับได้ดี ได้แก่ ซิลิกา อะลูมินา และถ่านหิน และตัวดูดซับที่อ่อน เช่น น้ำตาล หรืออาจแบ่งออกตามความมีขั้ว เช่น ออกไซด์ต่างๆ เป็นพวกที่มีขั้ว ส่วนถ่านหินเป็นพวกที่ไม่มีขั้ว และ สำหรับซิลิกาจะเป็นตัวดูดซับที่นิยมใช้กันมากที่สุด ไม่เพียงแต่ใช้ในคอลัมน์เท่านั้นยังใช้ในเทคนิค TLC อีกด้วย สำหรับงานวิจัยนี้ตัวดูดซับที่ใช้ คือ Amberlite XAD – 16 resin ซึ่งใน

การแยกสารจะนำสารละลายตัวอย่างผ่านลงไปในคอลัมน์ที่มีตัวดูดซับบรรจุอยู่ ตัวดูดซับจะดูดซับเอาสารที่มีความเป็นกลางไว้ ส่วนสารที่มีประจุจะไม่ถูกดูดซับ จากนั้นจะชะสารที่ถูกดูดซับไว้บนผิวของตัวดูดซับออกมาด้วยสารละลายผสม เช่น อะซีโตน เมทานอล และเอทานอล เป็นต้น

สารอิลูเอนท์หรือเฟสเคลื่อนที่ ตัวชะหรือเฟสเคลื่อนที่มีหน้าที่พาสารที่ต้องการแยกหรือชะสารที่ต้องการแยกออกมาจากคอลัมน์ โดยใช้ความเร็วที่แตกต่างกัน ซึ่งในการเลือกใช้ตัวชะนั้นต้องคำนึงถึงความมีขั้วเป็นสำคัญ โดยให้สัมพันธ์กับสารที่ต้องการแยก และชนิดของตัวดูดซับ

2.6.2 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-Exchange Chromatography)

หลักการของการแยกสารจะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพของไอออนในสารละลายกับไอออนที่มีประจุตรงกันข้าม ซึ่งอยู่ที่ผิวของเฟสอยู่นิ่ง ตัวแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchanger) ประกอบด้วยของแข็งที่มีรูพรุนซึ่งปกติแล้วจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วยเคาน์เตอร์ไอออน (counter ion) ที่มีประจุตรงข้ามกับหมู่ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่บรรจุ นั่นคือ ไอออนของเฟสเคลื่อนที่จะมีประจุที่เหมือนกับไอออนที่ต้องการแยก ซึ่งไอออนดังกล่าวจะรวมกับหมู่ที่อยู่บนผิวของเรซินในลักษณะเป็นคู่ไอออน (ion pair) เพื่อทำให้ประจุทั้งหมดอยู่ในสภาวะสมดุล

2.7 การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

โครมาโทกราฟีแบบการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction)

เป็นเทคนิคการสกัดโดยใช้เฟสของแข็งเป็นตัวดูดซับ (sorbent) ซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่สำคัญในการวิเคราะห์อยู่ 2 ประการ ดังนี้

1) เป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

2) ขจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากสารตัวอย่าง

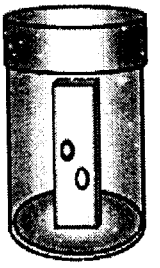
เมื่อสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์สามารถดูดซับได้บนวัสดุดูดซับ หรือไหลผ่านได้ในขณะสิ่งที่ปนเปื้อนถูกดูดซับไว้ ดังนั้นจึงมีขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการทดลอง 2 วิธี ได้แก่ การคงอยู่ของสารตัวอย่าง และการคงอยู่ของสารปนเปื้อน ซึ่งในปัจจุบันส่วนมากตัวดูดซับที่ใช้มักทำมาจากสารโพลิเมอร์ (polymer) โดยใช้หลักการแบบนอร์มอลเฟส (normal phase) จะใช้เฟสอยู่นิ่งเป็นแบบไม่มีขั้ว (non-polar) เช่น octadecyl silane และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารที่มีขั้ว เช่น น้ำ เมทานอล อะซิโทไนไทรล์ เป็นต้น ลำดับของการชะของสารตัวอย่างจะขึ้นกับสภาพความมีขั้วของสารว่า สามารถละลายได้ดีกับตัวชะแบบใด ถ้าหากใช้ตัวชะที่มีขั้ว สารประกอบที่มีขั้วจะถูกชะล้างออกมาก่อน เนื่องจากมันชอบที่จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ ส่วนสารประกอบที่ไม่มีขั้วจะถูกยึดอยู่ในคอลัมน์ทำให้ถูกชะล้างออกมาทีหลัง สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ

2.8 เทคนิคการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารฟีนาซีน

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ราคาไม่แพงเป็นโครมาโทกราฟีชนิดที่มีเฟสนิ่งเคลือบบนแผ่นกระจก แผ่นอะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกโพลีเอทิลีน จุดสารที่ต้องการแยกลงบนเฟสอยู่นิ่งเป็นจุด ๆ นำไปใส่ในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายอยู่ด้านล่าง โดยมีกระดาษกรองที่เปียกชุ่มด้วยตัวทำละลายแนบผนังในของภาชนะ เพื่อให้ระบบในภาชนะปิดอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 2.3 ปล่อยให้ตัวทำละลายขึ้นถึงขีดกำหนด แล้วนำแผ่นโครมาโทแกรมออกจากภาชนะ และปล่อยทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหย แล้วหาค่า R_f ออกมา ซึ่งค่า R_f เป็นค่าเฉพาะตัวของสาร ค่า R_f คำนวณได้จากอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ดังสมการ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$



รูปที่ 2.3 ภาพตัวอย่างการทดลองโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

2.9 เทคนิคสเปกโทรสโกปี

ในการศึกษาอิทธิพลของแสง และ อิทธิพลของ pH ได้ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีในการศึกษา

สเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) เป็นการศึกษาถึงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า หรือคลื่นแสง กับสสาร เช่น โมเลกุล อะตอม ไอออนหรือนิวเคลียส ในปัจจุบันวิชาสเปกโทรสโกปีมีขอบเขตกว้างขวางมาก โดยครอบคลุมถึงการศึกษาการใช้เครื่องมือต่างๆ ที่ทำหน้าที่ให้แหล่งกำเนิดคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า การแยกคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าออกเป็นช่วงความยาวคลื่นในช่วงต่างๆ กับการวัดการดูดกลืนคลื่นแสงของสสาร ตลอดจนการบันทึกข้อมูลออกมาเป็นตัวเลขหรือสเปกตรัม ซึ่งสเปกโทรสโกปีมีความสำคัญอย่างมากในด้านเคมีวิเคราะห์ ส่วนจะใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และความเหมาะสมในการใช้งานแต่ละประเภท ดังนั้นในการศึกษาทางสเปกโทรสโกปี จึงจำเป็นต้องศึกษาสมบัติของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและความ

เป็นไปได้ของระดับพลังงานของสสารที่เกิดอันตรกิริยา หรือความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการเกิดการดูดกลืนคลื่นแสงนั้น ๆ

หลักการที่สำคัญในการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี คือ หลักการดูดกลืนและการคายแสง ซึ่งคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าอาจเกิดอันตรกิริยาร่วมกับสสารได้หลายแบบ ถ้าเป็นการถ่ายเทพลังงานจากลำแสงของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าไปยังสสาร เรียกกระบวนการนี้ว่า การดูดกลืนแสง ส่วนกระบวนการที่ตรงกันข้ามคือ การคายแสง ซึ่งส่วนหนึ่งของพลังงานภายในสสารถูกเปลี่ยนไปเป็นพลังงานแสง

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาทางสเปกโทรสโกปี มีชื่อเรียกกันหลายอย่างตามความซับซ้อนของส่วนประกอบในเครื่องมือแต่ละแบบ รวมทั้งประสิทธิภาพในการใช้งาน ตัวอย่างเครื่องมือ เช่น

1. เครื่องคัลเลอริมิเตอร์ (Colorimeter) เป็นเครื่องมือที่มีส่วนประกอบอย่างง่าย ๆ ไม่ซับซ้อนบางทีเรียกว่า เครื่องเทียบสี ซึ่งอาศัยการอ่านจากตา หรือวัดความเข้มแสงของสารที่ต้องการวิเคราะห์เทียบกับสีหรือความเข้มแสงของสารมาตรฐานซึ่งค่าความคลาดเคลื่อน เท่ากับ ±5%

2. เครื่องโฟโตมิเตอร์ (Photometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวัดความเข้มของแสง มีราคาค่อนข้างถูก ใช้ฟิลเตอร์เป็นอุปกรณ์ที่ใช้แยกแสงออกเป็นช่วงคลื่นต่าง ๆ และยังใช้เซลล์รับแสง (photocell) หรือหลอดรับแสง (phototube) เป็นเครื่องตรวจวัดแสง

3. เครื่องสเปกโทรมิเตอร์ (Spectrometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต วิสิเบิล และอินฟราเรด ใช้โมโนโครมาเตอร์ เป็นอุปกรณ์ที่ใช้แยกแสง เครื่องมือนี้อาศัยหลักการการเปลี่ยนแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้า โดยการใช้เซลล์รับแสง หรือหลอดรับแสงเป็นเครื่องตรวจวัดแสง

4. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่มีส่วนประกอบคล้ายคลึงกับเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ แต่มีความซับซ้อนมากกว่า และมีราคาแพงกว่าเครื่องมือชนิดอื่นๆ โดยใช้โมโนโครเมเตอร์เป็นอุปกรณ์ ที่ใช้แยกแสงออกเป็นช่วงคลื่นแคบๆ ที่ต่อเนื่องกันอย่างอัตโนมัติ รวมทั้งใช้หลอดรับแสง หรือหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube) ที่เป็นเครื่องมือวัดความเข้มแสงที่มีความไวสูง และเครื่องมือนี้สามารถบันทึกสเปกตรัมออกมาได้อย่างอัตโนมัติ

ในส่วนของงานวิจัยนี้ได้ใช้เครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในการศึกษาจึงขอลงรายละเอียดเฉพาะเทคนิคของเครื่อง อัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เท่านั้น

เครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เป็นเครื่องมือที่อาศัยเทคนิคการวิเคราะห์สารโดยใช้หลักการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลของสารตัวอย่าง เช่น สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ หรือสารประกอบเชิงซ้อน โดยนำสารตัวอย่างใสใส่ในเซลล์ควอร์ตซ์ (quart) แล้ววางในบริเวณใกล้แหล่งกำเนิดแสง สารตัวอย่างจะดูดกลืนรังสี หรือแสงบางส่วนไว้

แสงที่ไม่ดูดกลืนจะผ่านออกมายังเครื่องตรวจวัดแสงคือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ เครื่องวัดแสงจะทำการวัดปริมาณแสงที่ออกมา โดยการหักล้างกับปริมาณของแสงก่อนดูดกลืน จากนั้นจะทำการประมวลผลเป็น สเปกตรัม ซึ่งแสดงผลออกมาในรูปความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าความยาวคลื่นในส่วนหลักการทำงานและส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ดังแสดงในภาคผนวก ข

2.10 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีน (Bioassay)

การทดสอบสารฟีนาซีนในการเป็นสารปฏิชีวนะนั้น ทำได้โดยใช้อาหารสูตร PDA นำมาปรับค่า pH ให้เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ประกอบไปด้วย 20 mM phosphate, 20 mM citrate แทนน้ำ ผสมเซลล์แบคทีเรีย กับ 2% ของวุ้นอาหารที่อุ่น ซึ่งมี 1% peptone (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วเทลงบนอาหาร PDA medium ส่วนการเตรียมแผ่น paper disk ที่มีสารปฏิชีวนะเคลือบอยู่บนแผ่น paper disk นั้น โดยระเหย 1.5 mM สาร phenazine-1-carboxylic acid ในเมธานอลที่หยดบนแผ่น paper disk และวางแผ่น paper disk ดังกล่าวลงบนอาหารแข็งสูตร PDA สำหรับเชื้อรา จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารวุ้น เจาะหลุมเล็ก ๆ บนอาหารวุ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร และใส่แผ่น paper disk ลงไปหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 2-3 วัน (Brisbane et al., 1987) และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

แบคทีเรียที่นิยมใช้ในการตรวจสอบทางชีวภาพของสารฟีนาซีน นั้น ได้แก่ เชื้อ *Bacillus subtilis, Escherichia Coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมีวิธีการศึกษาดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบในอาหารที่เชื้อนั้นสามารถเติบโตได้ดี เพื่อใช้เตรียม culture ต่อไป จากนั้นอุ่นวุ้นอาหารให้อยู่ในสภาวะที่เป็นของเหลว เติมเซลล์ของแบคทีเรียลงในวุ้นอาหารที่อุ่นๆ ผสมให้เข้ากัน นำไปเทลงบน plate แล้วปล่อยให้เย็นลง จากนั้นหยดสารปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบลงบน plate ที่เป็นหลุม แล้วเก็บ plate นั้นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 วัน แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Stead et al., 1996)