บทที่ 3

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 AGILENT 8453 UV-Visible Spectrophotometer, Germany

1.2 Autoclave, model No. 1941x, Wiscosin Aluminum Foundry, USA

1.3 Analytical Balance, Sartorious, Germany

1.4 Centrifuge, Kokusan type H-11N, Biomed group, Japan

1.5 Deionization water, Simplicity 185, Millipore Corporation, USA

1.6 Filter paper, 1 qualitative circles 125 mm dia. Cat No. 1001 125, Whatman

1.7 Filter paper, 42 qualitative circles 125 mm dia. Cat No. 1442 125, Whatman

1.8 Freezer at -20 ° C, Model SF-C691, SANYO, Thailand

1.9 Glass column (55 cm x 5.5 cm, i.d.)

1.10 Low pressure rotary evaporator, model R-114, Buchi, Switzerland

1.11 Magnetic stirrer, model sp 46920-26, Barustead Thermolyne, lowa, USA

1.12 Orbital shaker, model SA-31, Yamato Scientific, Japan

1.13 pH meter, Denver Instrument, model 251, USA

1.14 Reverse Osmosis รุ่น Rio55, Millipore Corporation, USA

1.15 Ultrasonic bath, Branson Smithkline Company, USA

1.16 เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC), Waters 600 HPLC pump, Waters 2996 Photodiode Array detector, USA

สารเคมี

2.1 Acetonitrile, Carlo Erba, Italy

2.2 Acetonitrile, HPLC grade, Lab Scan, Ireland

2.3 Agar powder, Himedia, India

2.4 Amberlite XAD-16 resin, Sigma, USA

2.5 Chromabond® NH_2 cartridge, Macherey-Nagel, Germany

2.6 Chromabond® OH cartridge, Macherey-Nagel, Germany

2.7 Chromabond® SiOH cartridge, Macherey-Nagel, Germany

2.8 Dichloromethane, Carlo Erba, Italy

2.9 Dichloromethane, HPLC grade, Lab Scan, Ireland

2.10 Glycerol, Carlo Erba, Italy

2.11 Hydrochloric acid, Merck, Germany

2.12 Magnesium chloride, Carlo Erba, Italy

2.13 Magnesium sulphate, Univar, Australia

2.14 Methanol, Carlo Erba, Italy

2.15 Methanol, HPLC grade, Lab Scan, Ireland

2.16 Nutrient agar, Himedia, India

2.17 Peptone, Oxoid, England

2.18 Potassium sulphate, Ajax Chemicals, Australia

2.19 Proteose peptone, Himedia, India

2.20 Silica gel 60, Merck, Germany

2.21 Sodium chloride, Prung Thip, Thailand

2.22 Sodium hydroxide, Ajax Chemicals, Australia

2.23 TLC, aluminium sheets silica gel 60 F_{254}, Merck, Germany

2.24 Trifluoroacetic acid, BDH Chemicals, England

2.25 Tryptone type I, Himedia, India

2.26 Yeast extract powder, Himedia, India

โครงการย่อยที่1. การศึกษาสมบัติบางประการของสารฟีนาซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

วิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของสารฟีนาซีน

3.1.1 การหาค่าจุดหลอมเหลวของสารฟีนาซีน

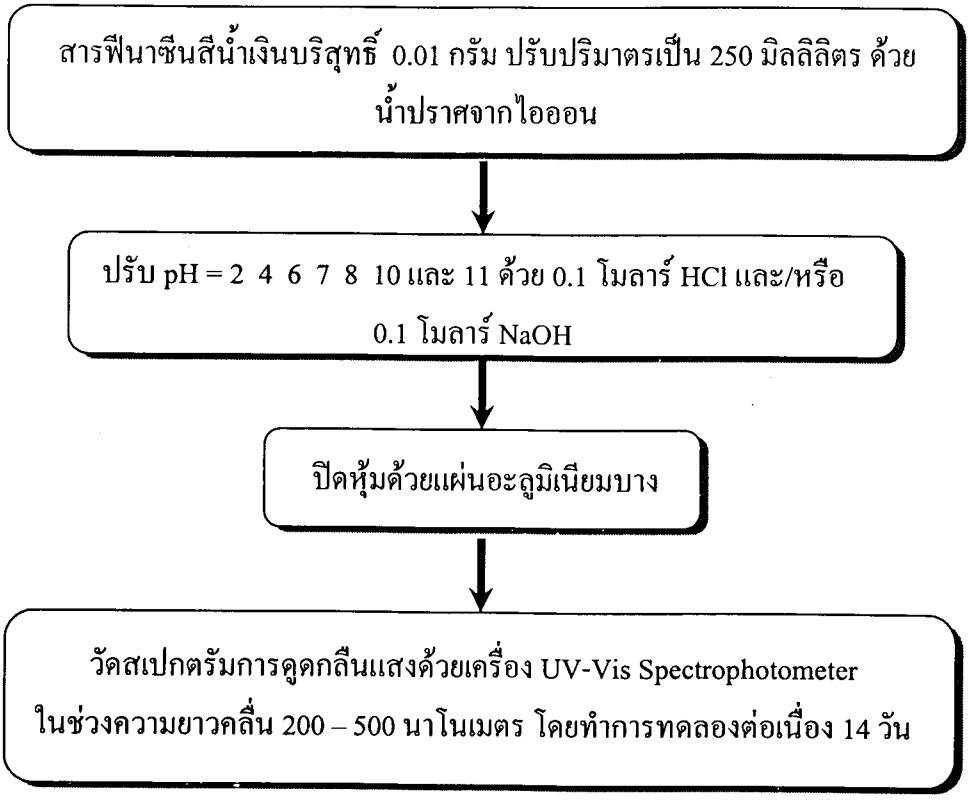
ทำการทดลองโดยนำสารฟีนาซีนสีน้ำเงินและสารฟีนาซีนสีเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วในรูปของผลึก ไปหาค่าจุดหลอมเหลวด้วยเครื่องหาค่าจุดหลอมเหลวจากนั้นเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับค่าจุดหลอมเหลวอ้างอิงจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา (Fernández and Pizarro, 1997)

3.1.2 การศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว

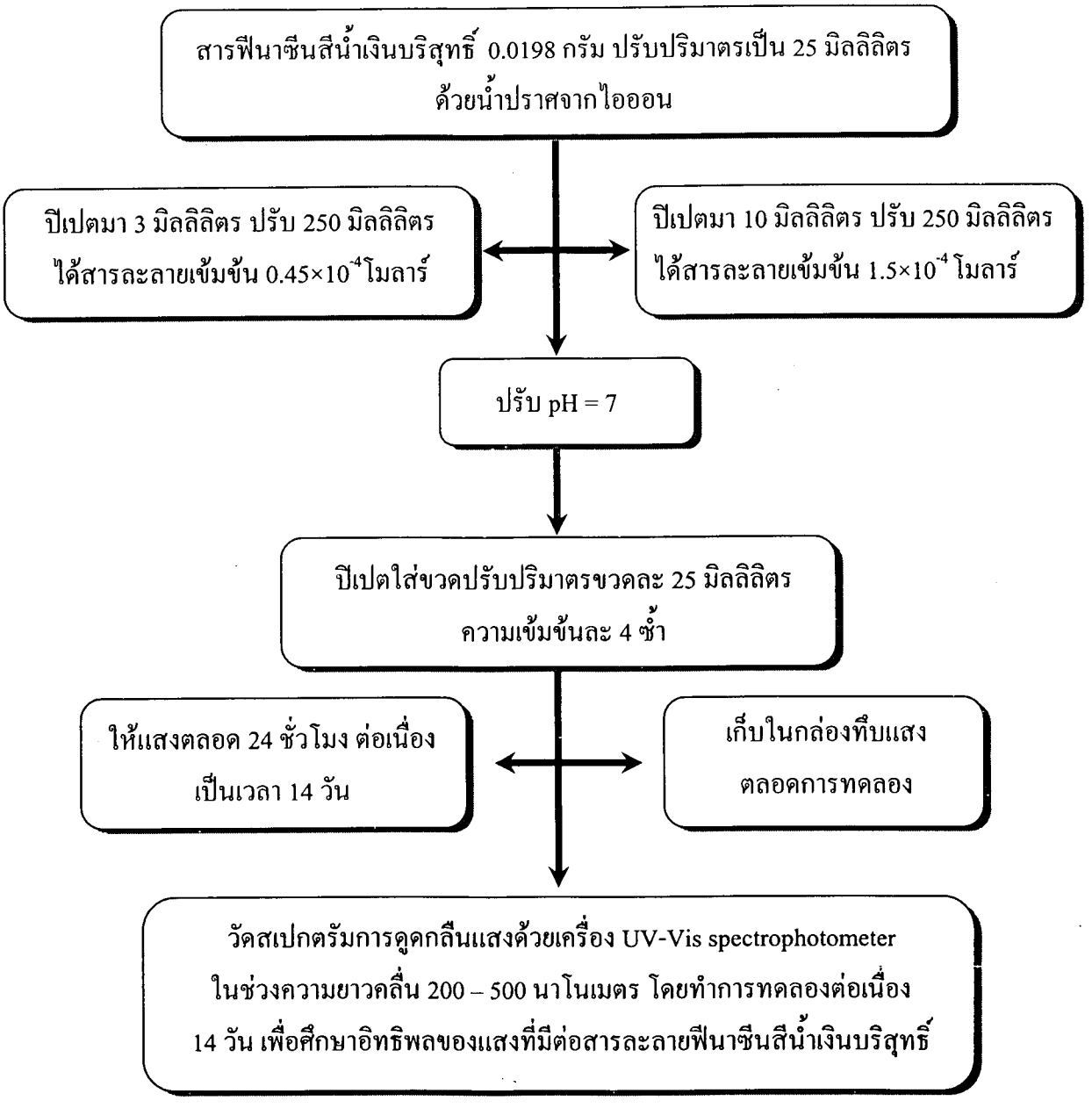
นำสารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ หรือ purified-phenazine มา 0.0100 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟีนาซีนเข้มข้น 0.004 % โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นปิเปตสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH เป็น 2 4 6 7 8 10 และ 11 ด้วย 0.1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก และ 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นหุ้มขวดปริมาตรด้วย aluminium foil เพื่อควบคุมไม่ให้แสงผ่านเข้าไปในสารละลายตัวอย่างนำไปวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ศึกษาในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร และใช้น้ำปราศจากไอออน เป็นสารละลายอ้างอิง ซึ่งทำการทดลองต่อเนื่อง เป็นเวลา 14 วัน ทำการทดลองสองซ้ำ ซึ่งขั้นตอนการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.1

3.1.3 การศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว

นำสารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ หรือ purified-phenazine มา 0.0198 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรเพื่อทำเป็น Stock ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าวมา 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.45×10^{-4} โมลาร์ ปรับ pH เท่ากับ 7 จากนั้น ปิเปตสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วมาปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 8 ขวดโดยแบ่งเป็น 2 สภาวะการทดลอง คือ สารละลายในส่วนที่ให้แสง 4 ขวด ทำการทดลองโดยการให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดไฟขนาด 100 วัตต์ และ สารละลายในส่วนที่ไม่ให้แสง 4 ขวดโดยทำการทดลองในกล่องทึบแสง ส่วนสารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4} โมลาร์ ได้จากปิเปต Stock ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วมา 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเตรียมเช่นเดียวกับสารละลายที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.45×10^{-4} โมลาร์ นำสารละลายข้างต้นไปวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นสารละลายอ้างอิง ทำการทดลองต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน และขั้นตอนข้างต้นสรุปได้ดังรูปที่ 3.2



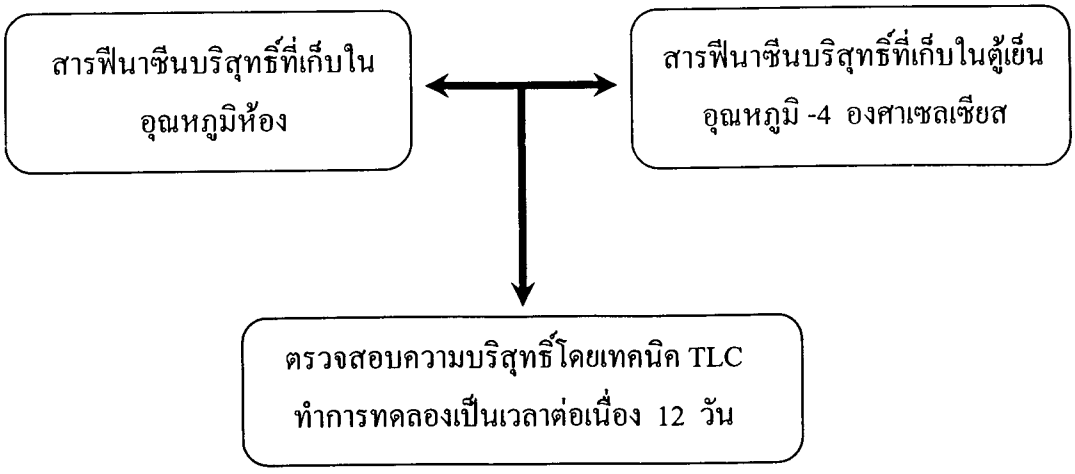
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์

3.1.4 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสลายตัวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์

ทำการทดลองเปรียบเทียบ 2 สภาวะระหว่างสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการสลายตัวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ สรุปเป็นขั้นตอนได้ ดังนี้



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ ที่มีผลต่อการสลายตัวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์

โครงการย่อยที่ 2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

วิธีดำเนินการทดลอง

3.2 การผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781

3.2.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารฟีนาซีน

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ดังตารางที่ 3.1 ทำการผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรียตามกระบวนการดังต่อไปนี้คือ

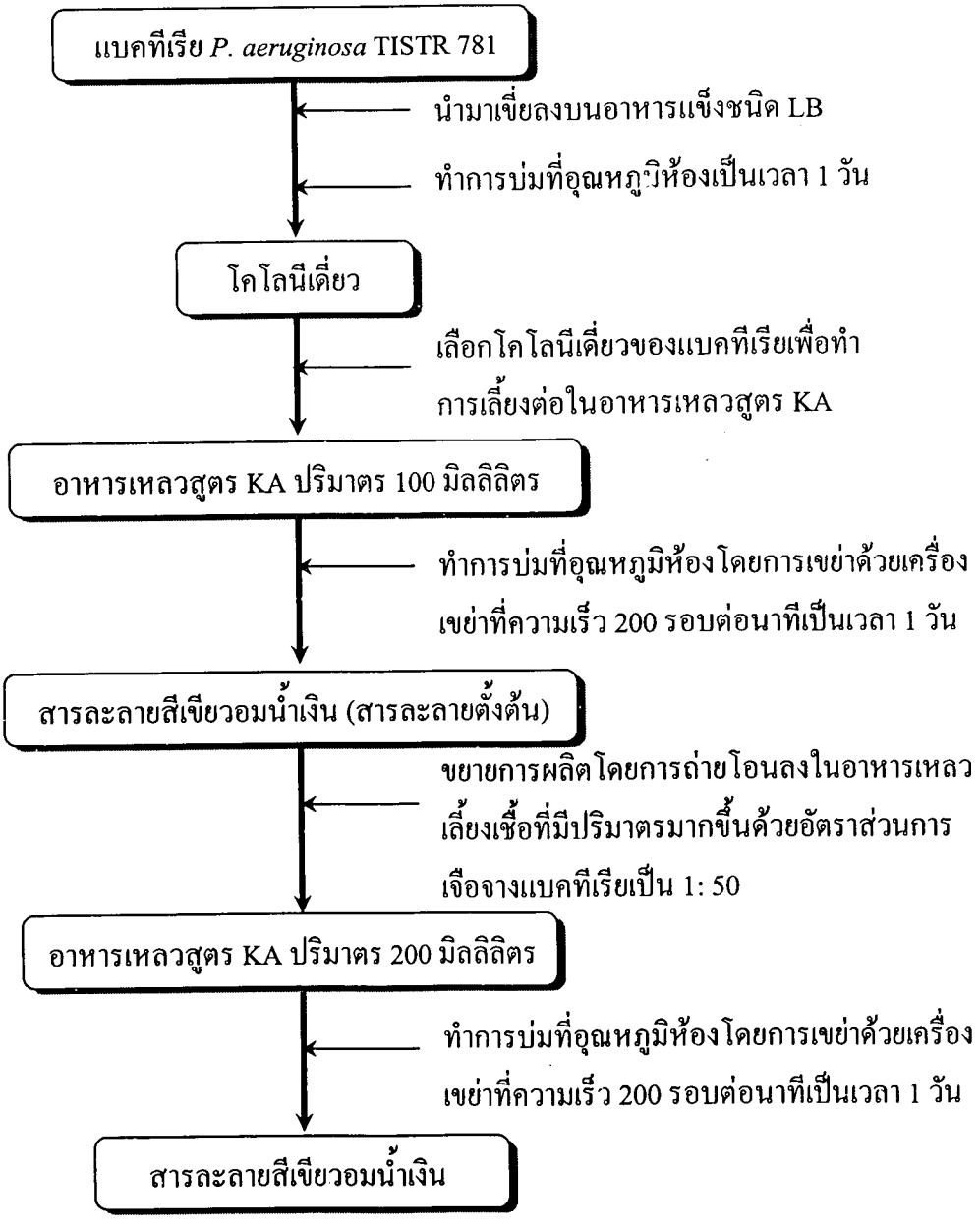
1. เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 ลงบนเพลทอาหารแข็งสูตร LB เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อจากเพลทที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยวจากการเลี้ยงในอาหารสูตร LB ลงในอาหารเหลวสูตร KA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารแขวนลอยแบคทีเรียสีเขียวอมน้ำเงิน เรียกสารที่ได้นี้ว่า สารละลายตั้งต้น (starter)

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ทำการเพิ่มปริมาตรโดยการปิเปตสารละลายตั้งต้นที่ได้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร (อัตราส่วนการเจือจางแบคทีเรียเป็น 1:50) ทำการเพิ่มออกซิเจนโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้สารแขวนลอยแบคทีเรียสีเขียวอมน้ำเงิน สามารถแสดงกระบวนการต่าง ๆ ในการผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 ได้ดังรูปที่ 3.4

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781

สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย	**สภาวะที่เหมาะสมที่สุด**
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด KA
อัตราส่วนในการเจือจางแบคทีเรีย	1 : 50
เวลาในการบ่ม	24 ชั่วโมง
ค่า pH ที่ใช้ในการบ่ม	7.0
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะ	อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 3.4 กระบวนการในการผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีน

1. นำสารฟีนาซีนทั้งในรูปครูดฟีนาซีนและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 ในรูปของผงหรือของเหลวจากโครงการวิจัยย่อยอื่นๆ เช่น สาร 1-hydroxyphenazine เป็นต้น ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะ (สารยับยั้งจุลินทรีย์) โดยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ *Bacillus subtilis, Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียที่ก่อโรคพืช ได้แก่ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*,

Enterobacter aerogenes, *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และ *Pseudomonas syringae* และเชื้อราที่ใช้ทดสอบนั้น ได้แก่ *Candida albicans*

2. ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีนโดยใช้อาหารวุ้นแข็ง Mueller-Hinton agar ซึ่งเพลทอาหารวุ้นแข็งชนิดนี้สามารถเตรียมได้ดังนี้คือ ชั่ง Mueller-Hinton agar มา 38 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร และปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย HCl 1 โมลาร์ หรือ NaOH 1 โมลาร์ จากนั้นทำให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันโดยใช้ความร้อน และ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ เทอาหารวุ้นที่ร้อนลงบนจานเพาะเชื้อและปล่อยทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในข้อ 1. โดยการเขี่ยเชื้อลงบนเพลทอาหารแข็งสูตร LB เป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของแบคทีเรียมาเจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ 5 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ McFarland No. 1.0 (3×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) แล้วนำสารละลายแบคทีเรียนี้มากวาดลงบนเพลทอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar ในข้อ 2. และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน

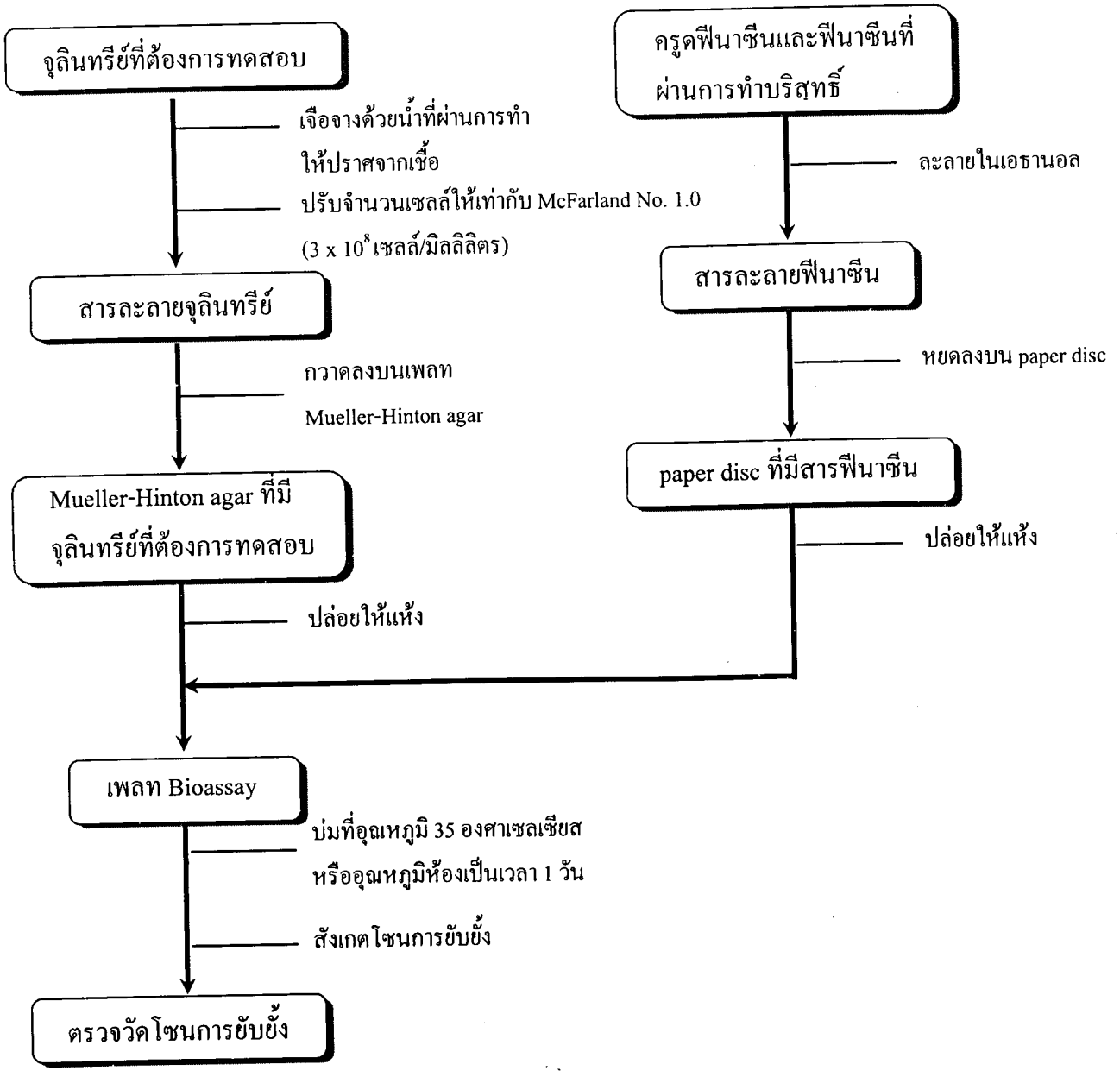
4. ทำการเตรียมแผ่น paper disc ที่มีสารปฏิชีวนะ (ครูดฟนาซีนและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์) เคลือบอยู่ โดยละลายครูดฟีนาซีนและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในเอธานอลก่อน จากนั้นหยดสารละลายของสารปฏิชีวนะที่ได้ บนแผ่น paper disc ที่เตรียมไว้ แล้วปล่อยให้เอธานอลระเหยจนแห้ง

5. นำแผ่น paper disc ที่แห้ง ดังกล่าว วางบนอาหารแข็งที่มีแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในข้อ 3.

6. เก็บและบ่มเชื้อจุลินทรีย์บน Petri plate ข้างต้นไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน

7. ตรวจสอบและเปรียบเทียบผลที่ได้กับชุดควบคุม (ที่ไม่มีสารปฏิชีวนะ) โดยทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้ง/ไม่เกิดการเติบโตของจุลินทรีย์ ด้วยสารยับยั้งของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนเหล่านั้น

8. สรุปผลการทดลองว่าสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนใด ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลินทรีย์ ที่นำมาทดสอบ และสามารถแสดงกระบวนการต่าง ๆ ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีนได้ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 กระบวนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781

โครงการย่อยที่ 3. การพัฒนาวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

3.3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย 70% อะซิโตไนไทรล์

นำอะซิโทไนไทรล์ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวด

2. สารละลายผสมของไดคลอโรมีเทน กับเมทานอล ในอัตราส่วน 95:5 (V/V)

นำไดคลอโรมีเทนปริมาตร 950 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดเก็บตัวทำละลาย สำหรับอัตราส่วนอื่นๆ ก็เตรียมได้เช่นเดียวกัน แต่ต่างกันที่การปรับอัตราส่วน

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 โมลาร์

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 12.0 โมลาร์ ปริมาตร 83.3 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1.0 ลิตร

4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น1.0 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม แล้วนำมาละลายในบีกเกอร์ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1.0 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร ด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้วเก็บไว้ในขวดพลาสติก

3.3.2 การศึกษากระบวนการแยกสารฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

1. นำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่มีสีเขียวอมน้ำเงินซึ่งได้หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781 ในอาหารเหลวสูตร KA เป็นเวลา 1 วัน มาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย NaCl และ $(NH_4)_2SO_2$ และสุดท้ายทำการปรับให้สารละลาย มี pH = 7.0 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 M หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 M

2. ทำการกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออก โดยการกรองผ่านกระดาษกรอง และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียและตะกอนต่าง ๆ ออกไป เก็บเอาเฉพาะสารละลายส่วนใส (สารละลายซูเปอร์นาแตนต์) ส่วนเซลล์แบคทีเรียและตะกอนต่าง ๆ นั้นทิ้งไป

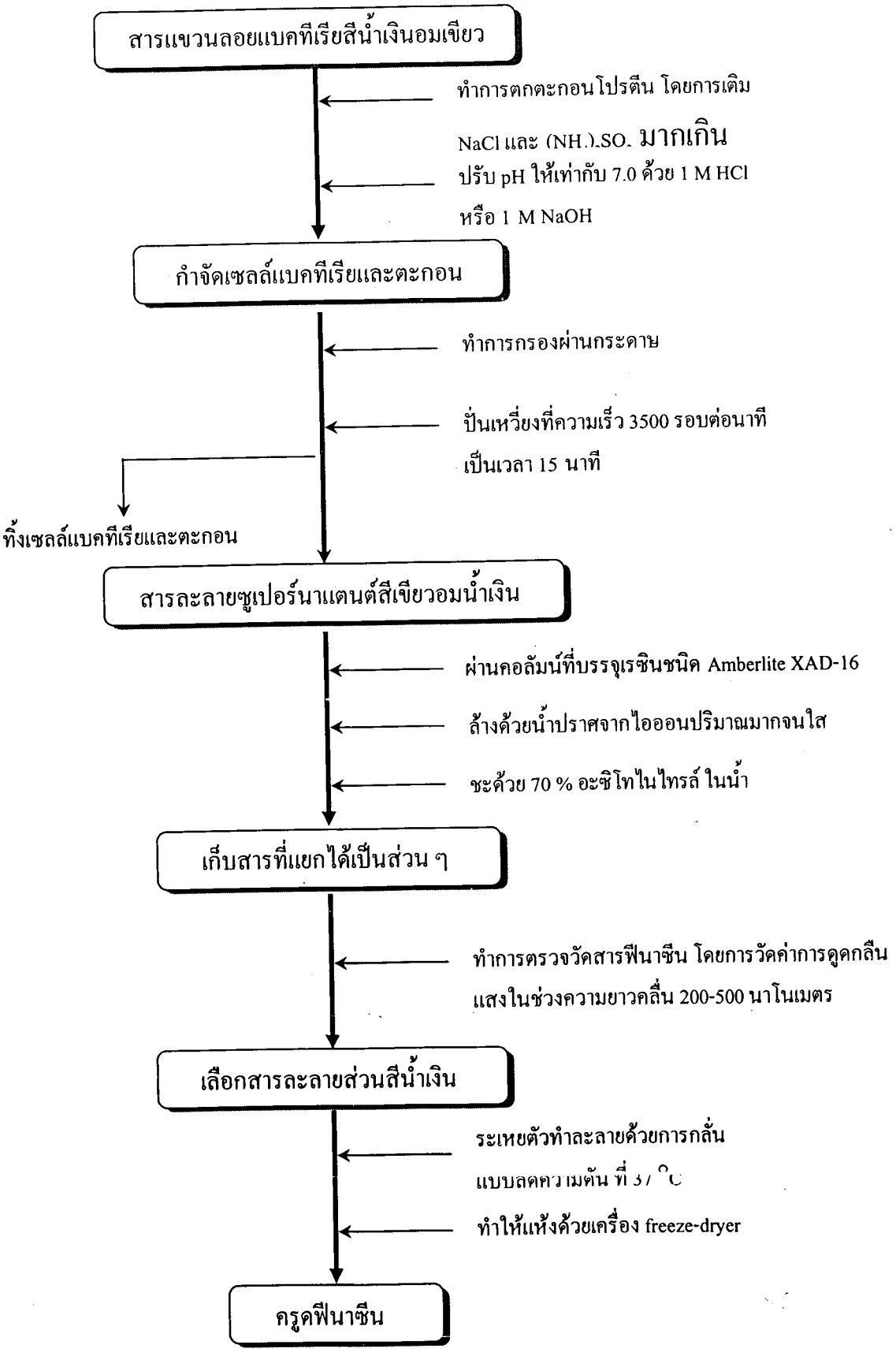
3. นำสารละลายส่วนใสจากข้อ 2 ผ่านลงในคอลัมน์ขนาด 5.5 x 55 เซนติเมตร บรรจุเรซิน Amberlite XAD-16 โดยปล่อยให้สารละลายไหลช้า ๆ ประมาณ 5 มิลลิลิตร/นาที สังเกตการเปลี่ยนสีของฟีนาซีนที่ถูกดูดซับไว้ในคอลัมน์ (สีเขียวอมน้ำเงิน) จนกระทั่งได้ปริมาณที่พอเหมาะล้างคอลัมน์ให้สะอาดด้วยน้ำกรองชนิด reversed osmosis ปริมาณมาก ๆ ให้สะอาดเพื่อกำจัดสารอาหารและเกลือต่าง ๆ จนกระทั่งน้ำที่ล้างออกจากคอลัมน์ใสไม่มีสี

4. ซะฟีนาซีนที่ถูกดูดซับไว้บนเรซินออกช้า ๆ ด้วยสารละลายผสม 70 % อะซิโทไนไทรล์ในน้ำ เก็บสารละลายที่ได้แยกเป็นส่วน ๆ ได้ 2 ส่วน ดังนี้

- ส่วนแรก จะได้สารละลายสีน้ำตาล
- ส่วนที่สองจะได้สารละลายสีน้ำเงินซึ่งเป็นส่วนที่สนใจทำการศึกษาต่อไป

1. ทำการตรวจสอบสารฟีนาซีนในสารละลายที่เก็บได้ในแต่ละส่วน โดยการนำมาวัดสเปคตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-500 นาโนเมตร

2. นำสารละลายที่เก็บได้จากข้อ 4 ซึ่งผ่านการตรวจสอบแล้วว่าให้สเปคตรัมการดูดกลืนแสงที่สอดคล้องกับอนุพันธ์ฟีนาซีน จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze-dryer สุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์ของฟีนาซีน ในลักษณะเป็นผงสีเขียวอมน้ำเงิน เรียกว่า "ครูดฟีนาซีน" (crude phenazine) แล้วนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถแสดงกระบวนการในการแยกสารฟีนาซีนได้ดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 กระบวนการในการแยกสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781

3.3.3 การพัฒนากระบวนการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

3.3.3.1 การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุซิลิกาเจล

การหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. นำแผ่น TLC ขนาด 2×6 เซนติเมตร ไปอบไล่ความชื้นในตู้อบเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. นำสารละลายครูดฟีนาซีนมาจุดบนแผ่น TLC จำนวน 2 – 3 จุด โดยแต่ละจุดซ้ำ 2 ครั้ง ปล่อยให้แล้วรอจนแห้งสนิท

3. ใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 97 ต่อ 3 และ 90 ต่อ 10 โดยปริมาตร แต่ละอัตราส่วนใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตรเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้สารละลายอิ่มตัว ก่อนวางแผ่น TLC

4. ปล่อยให้ตัวทำละลายขึ้นถึงตำแหน่งที่กำหนดไว้ แล้วนำแผ่น TLC ออกปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง

5. นำแผ่น TLC ที่ได้มาหาค่า R_f สังเกตแถบการแยก ตลอดจนเวลาที่ใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์

1. นำครูดฟีนาซีนปริมาณ 1.5 กรัม ละลายด้วยสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 โดยปริมาตร

2. กรองเพื่อเอาส่วนของสารที่ไม่ละลายออก

3. ผ่านสารละลายลงคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล ซึ่งทำการปรับสภาวะด้วย ไดคลอโรมีเทน

4. จากนั้นชะสารฟีนาซีนด้วยสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 โดยปริมาตร (อัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ได้จากการศึกษาโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง)

5. สามารถแยกเก็บสารได้ 3 ส่วนได้แก่ ส่วนแรกเป็นสารละลายสีเหลือง ส่วนที่สอง เป็นสารละลายสีเขียว และส่วนที่สามเป็นสารละลายสีน้ำเงิน

6. นำสารละลายแต่ละส่วนไปทำการลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยชนิดลดความดัน เพื่อกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ จนได้ปริมาตรน้อยที่สุด จากนั้นนำสารละลายที่ได้ เก็บไว้ในขวดเก็บสาร

7 เมื่อกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์หมดแล้วจะได้สารละลายในรูปของผลึก นำสารที่ได้ไปประยุกต์ และใช้ประโยชน์ต่อไป

3.3.3.2 การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction)

1. นำสารฟีนาซีนในลักษณะเป็นผงสีเขียวอมน้ำเงินปริมาณ 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μm เพื่อกำจัดตะกอน จากนั้นนำสารที่ได้จากการกรองมาสกัดด้วยสารละลายผสมของ 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง เก็บเอาชั้นไดคลอโรมีเทนรวมกัน และระเหยตัวทำละลายจนแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

2. นำสารฟีนาซีนจากข้อ 1 มาละลายไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผ่านลงในเฟสของแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ Chromabond® SiOH cartridge, Chromabond® OH cartridge และ Chromabond® NH_2 cartridge

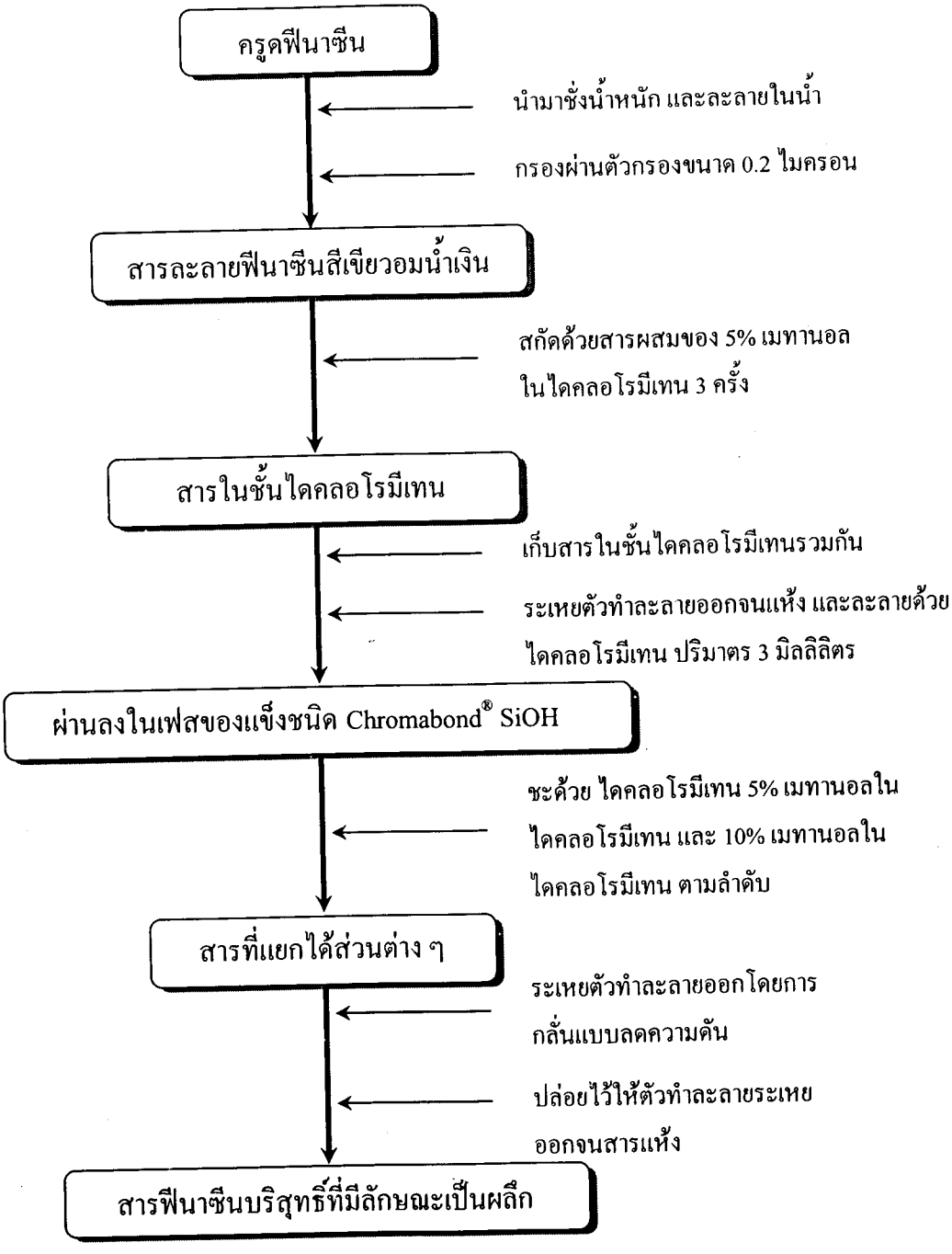
3. ทำการชะสารฟีนาซีนในข้อ 2 แบบเกรเดียนต์ด้วยสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทน 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และ 10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ สังเกตสารที่แยกได้จากเฟสของแข็งแต่ละชนิด แล้วเก็บสารที่แยกได้เป็นส่วน ๆ

4. ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้แต่ละส่วนเบื้องต้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) โดยใช้ระบบสารผสมของเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (1:1) เป็นตัวทำละลาย

5. เลือกชนิดของเฟสของแข็งที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนแล้ว นำสารฟีนาซีนที่ผ่านการแยกเบื้องต้นมาทำบริสุทธิ์ตามกระบวนการในข้อ 1-3 สามารถแสดงกระบวนการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนได้ดังรูปที่ 3.7

6. หลังจากผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ นำสารละลายที่แยกได้แต่ละส่วนไปทำการลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน เพื่อกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์จนได้ปริมาตรน้อยที่สุด จากนั้นนำสารละลายที่ได้ เก็บไว้ในขวดเก็บสาร

7. เมื่อกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์หมด จะได้สารละลายในรูปของผลึก นำสารที่ได้ไปประยุกต์และใช้ประโยชน์ต่อไป



รูปที่ 3.7 กระบวนการในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 ด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

3.3.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีน

3.3.4.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC)

การหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. นำแผ่น TLC ขนาด 2×7 เซนติเมตร ไปอบไล่ความชื้นในตู้อบเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. นำสารละลายฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Chromabond® SiOH cartridge แล้วมา

จุดบนแผ่น TLC จำนวน 2 – 3 จุด โดยแต่ละจุดซ้ำ 2 ครั้ง ปล่อยให้แล้วรอจนแห้งสนิท

3. ใช้ระบบตัวทำละลายที่ต้องการทดสอบดังต่อไปนี้ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทนต่อเอทิลอะซิเตต (9:1) ไดคลอโรมีเทนต่ออะซิโทน (4:1) ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (9:1) และไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (1:1) โดยปริมาตร แต่ละอัตราส่วนใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตรเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้สารละลายอิ่มตัว ก่อนวางแผ่น TLC
4. ปล่อยให้ตัวทำละลายขึ้นถึงตำแหน่งที่กำหนดไว้ แล้วนำแผ่น TLC ออกปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง
5. นำแผ่น TLC ที่ได้มาหาค่า R_f สังเกตแถบการแยก ตลอดจนเวลาที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม
6. เมื่อได้ชนิดของระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์ฟีนาซีนแล้ว นำสารที่แยกได้จากเฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH cartridge มาตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย TLC ตามกระบวนการในข้อ 1-5

3.3.4.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC)

1. สารละลายฟีนาซีนจาก *P. aeruginosa* TISTR 781 ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ประกอบด้วย

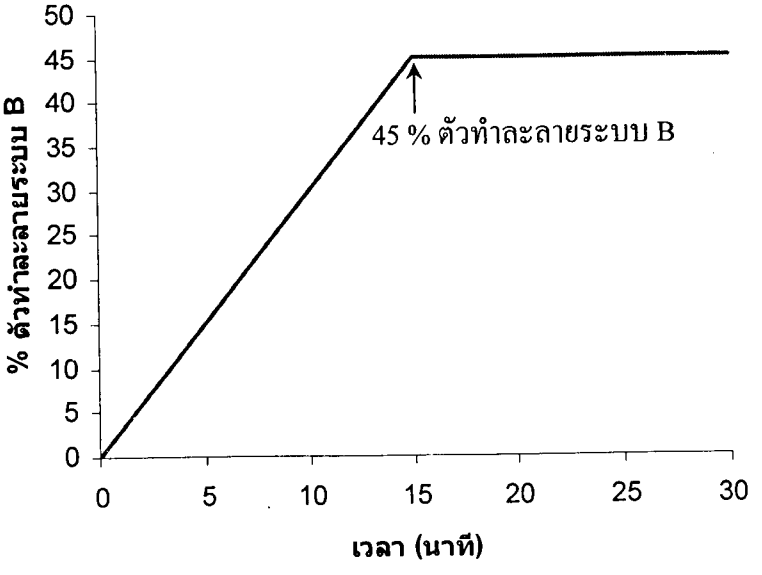
-สารละลายของครูดฟีนาซีนที่ได้จากการผ่านเรซิน Amberlite XAD-16 และชะด้วย 70% อะซิโตไนไทรล์ เก็บส่วนที่แยกออกจากคอลัมน์ หลังจากนั้นนำไปลดปริมาตรลงด้วยเครื่อง rotary evaporator ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC

-สารฟีนาซีนแต่ละส่วนที่แยกได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน Chromabond® SiOH cartridge และชะด้วย ไดคลอโรมีเทน 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และ 10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปลดปริมาตรลงด้วยเครื่อง rotary evaporator ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนที่แยกได้ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ชนิด Neucleosil C_{18} (5 ไมครอน, 150 x 4.6 มิลลิเมตร) ใช้เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย ตัวทำละลายระบบ A (น้ำ: กรดไตรฟลูออโรอะซิติก, 100: 0.01, โดยปริมาตร) และตัวทำละลายระบบ B (น้ำ: อะซิโทไนไทรล์: กรดไตรฟลูออโรอะซิติก, 10: 90: 0.01,

โดยปริมาตร) ทำการชะโดยระบบเกรเดียนต์ โดยการเพิ่มตัวทำละลายระบบ B จาก 0 ถึง 45% เป็นเวลา 15 นาที และใช้สภาวะนี้จนกระทั่งหมดเวลาการวิเคราะห์ โดยใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถแสดงรูปแบบการชะแบบเกรเดียนต์ได้ดังรูปที่ 3.4 แล้วกรองเฟสเคลื่อนที่ก่อนใช้ด้วยเยื่อเลือกผ่านขนาด 0.45 ไมครอน และกำจัดออกซิเจนก่อนใช้

3. ทำการฉีดสารฟีนาซีนที่ต้องการวิเคราะห์เข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรสาร 20 ไมโครลิตร และใช้เวลาการวิเคราะห์ 30 นาที ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สามารถแสดงสภาวะต่างที่ใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงได้ดังตารางที่ 3.8



รูปที่ 3.8 รูปแบบการชะในการตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

ตารางที่ 3.2 สภาวะต่าง ๆ ของเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูงในการตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

ระบบต่าง ๆ	สภาวะที่ใช้
คอลัมน์	Nucleosil C_{18} (5 ไมครอน, 150 x 4.6 มิลลิเมตร)
เฟสเคลื่อนที่	ตัวทำละลาย A; น้ำ: กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (100: 0.01, v/v)
	ตัวทำละลาย B; น้ำ: อะซิโทไนไทรล์: กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (10: 90: 0.01, v/v)
อัตราการไหล	1 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรการชะ	20 ไมโครลิตร
เครื่องตรวจวัด	Photodiode Array detector
ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด	254 นาโนเมตร
เวลาการวิเคราะห์	30 นาที