บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

โครงการย่อยที่ 1. การศึกษาสมบัติบางประการของสารฟีนาซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของสารฟีนาซีน

จากการทดลองเพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของสารฟีนาซีน ได้ทำการศึกษาหาจุดหลอมเหลวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินและสีเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว เพื่อเปรียบเทียบบระหว่างจุดหลอมเหลวที่ได้จากการทดลองกับจุดหลอมเหลวที่ได้มีการอ้างอิงผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าจุดหลอมเหลวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงิน และสารฟีนาซีนสีเหลือง ที่ได้จากการทดลอง เปรียบเทียบกับจุดหลอมเหลวที่ได้มีการอ้างอิง

สารฟีนาซีน	ครั้งที่	จุดหลอมเหลว (°C)	
		จากการทดลอง	จากเอกสารอ้างอิง (Fernándaz and Pizarro, 1997)
สีน้ำเงิน	1	127-132.5	133d
	2	125.5-133	
	3	126-134.5	
ค่าเฉลี่ย		126.2-133.2	
สีเหลือง	1	152-155	*237-240 **157-158
	2	150-153.4	
	3	151.5-154	
ค่าเฉลี่ย		151.2-153.5	

หมายเหตุ เนื่องจากสารฟีนาซีนสีเหลืองที่สำคัญนั้นมี 2 ชนิด

โดย * แทนค่าจุดหลอมเหลวของ Phenazine-1-carboxylic acid

** แทนค่าจุดหลอมเหลวของ 1- Hydroxyphenazine

d แทนค่าจุดหลอมเหลวที่อาจเกิดการสลายตัวก่อน

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 พบว่าสารฟีนาซีนสีน้ำเงินมีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับ Pyocyanin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารฟีนาซีนและมีสีน้ำเงิน และพบว่าจุดหลอมเหลวของสารฟีนาซีนสีเหลืองมีค่าใกล้เคียงกับ จุดหลอมเหลวของ 1- Hydroxyphenazine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารฟีนาซีนและมีสีเหลือง

4.2 การศึกษาการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

4.2.1 การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC)

ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อทำการตรวจสอบ การแยกครูดฟีนาซีนด้วยเทคนิค TLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ของระบบ คือ สารละลายผสมเมทานอลกับไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด ในการแยกครูดฟีนาซีน พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการทดลอง คือ สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 โดยปริมาตร เนื่องสามารถแยกสารฟีนาซีนได้ดี และใช้เวลาในการทดลองไม่นานเกินไป โดยผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่า R_f และแถบที่แยกได้ของครูดฟีนาซีน ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่โดยใช้เทคนิค TLC

เฟสเคลื่อนที่	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)			ระยะทางทั้งหมดที่สารเคลื่อนที่ (cm)	ค่า R_f		
	แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3
3%MeOH:97%CH_2Cl_2 โดยปริมาตร	2.1	2.4	3.6	4	0.53	0.60	0.90
	2.1	2.4	3.6	4	0.53	0.60	0.90
5%MeOH:95%CH_2Cl_2 โดยปริมาตร	2.8	3.1	3.6	4	0.70	0.78	0.90
	2.8	3.1	3.6	4	0.70	0.78	0.90
10%MeOH:90%CH_2Cl_2 โดยปริมาตร	2.7	2.9	3.5	4	0.68	0.73	0.88
	2.7	2.9	3.5	4	0.68	0.73	0.88

จากการแยกสารฟีนาซีนด้วยเทคนิค TLC โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกัน 3 อัตราส่วน พบว่า เกิดแถบการแยก 3 แถบ ได้แก่ แถบที่ 1 คือ แถบสีน้ำเงิน แถบที่ 2 คือ แถบสีเขียว และแถบที่ 3 คือ แถบสีเหลือง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับ

เมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5โดยปริมาตร กับอัตราส่วนอื่นๆ พบว่าสารละลายผสมไดคลอโร-มีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 สามารถแยกแถบทั้ง 3 แถบ ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และใช้เวลาในการทดลองไม่นานเกินไป ส่วนสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 สามารถแยกแถบทั้ง 3 ได้ดีเช่นเดียวกัน แต่ใช้เวลาในการทดลองนานเกินไป และ สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 90 ต่อ 10ใช้เวลาในการทดลองไม่นานแต่แยกสารได้ไม่ดีเท่าที่ควร

4.2.2 การศึกษาสารฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

ทำการทดลองเพื่อศึกษาว่าสารฟีนาซีนสีน้ำเงินหลังการทำบริสุทธิ์เมื่อทำการแยกโดยใช้เทคนิค TLC แล้วมีแถบการเคลื่อนที่เป็นอย่างไร และเมื่อเวลาผ่านไปจะมีการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนาซีนอย่างไร โดยในการทดลองได้เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนต่าง ๆ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่4.3

ตารางที่ 4.3 ค่า R_f และลักษณะสีของแถบการเคลื่อนที่ของสารฟีนาซีนบริสุทธิ์ 3 แถบ โดยใช้เทคนิค TLC

สีสารที่สังเกตเห็นหลังการทำให้บริสุทธิ์	เฟสเคลื่อนที่	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)			ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ทั้งหมด	ค่า R_f		
		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3
สีน้ำเงิน	5%MeOH:95%CH_2Cl_2	2.7	*	3.7	4	0.68	0	0.93
		2.8	*	3.7	4	0.70	0	0.93
	7%MeOH:93% CH_2Cl_2	1.8	*	3.5	4	0.45	0	0.88
		1.9	*	3.6	4	0.48	0	0.90
	10%MeOH:90%CH_2Cl_2	2.1	*	3.5	4	0.53	0	0.88
		2.1	*	3.5	4	0.53	0	0.88
สีเขียว	5%MeOH:95%CH_2Cl_2	2.7	3	3.6	4	0.68	0.75	0.90
		2.7	3	3.5	4	0.68	0.75	0.88
	3%MeOH:97%CH_2Cl_2	2.2	2.4	3.6	4	0.55	0.6	0.9
		2.1	2.4	3.6	4	0.525	0.6	0.9
	10%MeOH:90%CH_2Cl_2	3.1	3.3	3.75	4	0.78	0.83	0.94
		3.1	3.3	3.75	4	0.78	0.83	0.94

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

สีสารที่สังเกตเห็นหลังการทำให้บริสุทธิ์	เฟสเคลื่อนที่	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)			ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ทั้งหมด	ค่า R_f		
		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3
สีเหลือง	5%MeOH:95%CH_2Cl_2	3.2	*	3.7	4	0.80	0	0.93
		3.3	*	3.7	4	0.83	0	0.93
	3%MeOH:97%CH_2Cl_2	2.4	*	2.9	4	0.60	0	0.73
		2.5	*	3	4	0.63	0	0.75
	10%MeOH:90%CH_2Cl_2	3.3	*	3.75	4	0.83	0	0.94
		3.2	*	3.7	4	0.80	0	0.93

หมายเหตุ แถบที่ 1 คือ แถบสีน้ำเงิน แถบที่ 2 คือ แถบสีเขียว แถบที่ 3 คือ แถบสีเหลือง

* คือ ไม่ปรากฏแถบการเคลื่อนที่

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนของเฟสการเคลื่อนที่ที่ต่างกัน ซึ่งให้ผลการทดลองที่ตรงกัน คือ สารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิคTLC พบว่า มีแถบการเคลื่อนที่ 2 แถบ คือ แถบสีน้ำเงิน และแถบสีเหลืองแสดงว่าสารฟีนาซีนสีน้ำเงินอาจไม่บริสุทธิ์ จึงมีแถบสีเหลืองซึ่งอาจเป็นสารฟีนาซีนสีเหลืองซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปสารฟีนาซีนสีน้ำเงินจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารฟีนาซีนสีเขียว เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิค TLC พบว่า มีแถบการเคลื่อนที่ 3 แถบ คือ แถบสีน้ำเงิน แถบสีเขียว และแถบสีเหลือง ตามลำดับ แสดงว่าสารฟีนาซีนสีเขียวอาจเกิดจากสารฟีนาซีนสีน้ำเงินมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป และเมื่อเก็บสารฟีนาซีนสีน้ำเงินจนมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารฟีนาซีนสีเหลือง เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิค TLC พบว่ามีแถบการเคลื่อนที่ 2 แถบ คือ แถบสีน้ำเงิน และแถบสีเหลือง ตามลำดับ แสดงว่าสารฟีนาซีนสีเหลืองที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินไม่บริสุทธิ์ จึงมีแถบสีน้ำเงินซึ่งอาจเป็นสารฟีนาซีนสีน้ำเงินปรากฏอยู่ และพบว่าเวลามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารฟีนาซีนสีน้ำเงิน

4.3 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์

ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างสองสภาวะ คือ สารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศา

เซลเซียส และ สารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส โดยใช้เทคนิค TLC ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร ทำการทดลองต่อเนื่องเป็นเวลา 12 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า R_f ของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ และแสดงลักษณะสีของแถบแยกโดยใช้เทคนิค TLC ของสารที่เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส และสารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 โดยปริมาตร

สารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์										
เก็บไว้ในตู้เย็น (-4 °C)						เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C)				
วันที่ทดลอง	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)		ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ทั้งหมด	ค่า R_f		ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)		ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ทั้งหมด	ค่า R_f	
	แถบที่ 1	แถบที่ 2		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 1	แถบที่ 2		แถบที่ 1	แถบที่ 2
1	1.7	*	4.9	0.35	*	1.7	*	4.9	0.35	*
	1.7	*	4.9	0.35	*	1.7	*	4.9	0.35	*
2	1.4	*	3.9	0.36	*	1.4	3.7	3.9	0.36	0.95
	1.5	*	3.9	0.39	*	1.4	3.7	3.9	0.36	0.95
3	1.4	*	3.9	0.36	*	1.5	3.7	3.9	0.38	0.95
	1.4	*	3.9	0.36	*	1.4	3.6	3.9	0.36	0.92
4	1.5	3.8	4	0.38	0.95	1.8	3.5	4	0.45	0.88
	1.4	3.7	4	0.35	0.93	1.9	3.6	4	0.48	0.90

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

สารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์										
เก็บไว้ในตู้เย็น (-4 °C)						เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C)				
วันที่ทดลอง	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)		ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ทั้งหมด	ค่า R_f		ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)		ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ทั้งหมด	ค่า R_f	
	แถบที่ 1	แถบที่ 2		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 1	แถบที่ 2		แถบที่ 1	แถบที่ 2
6	1.4	3	4	0.35	0.75	1.4	2.9	4	0.35	0.73
	1.3	3	4	0.33	0.75	1.2	2.8	4	0.30	0.70
8	1.2	3	4	0.30	0.75	1.4	3.1	4	0.35	0.78
	1.2	3	4	0.30	0.75	1.4	3.1	4	0.35	0.78
10	1.3	3.1	4	0.33	0.78	1.3	3.1	4	0.33	0.78
	1.3	3.1	4	0.33	0.78	1.2	3.1	4	0.30	0.78
12	1.3	2.3	4	0.33	0.58	1.1	2.5	4	0.28	0.63
	1.3	2.3	4	0.33	0.58	1.1	2.5	4	0.28	0.63

หมายเหตุ แถบที่ 1 คือ แถบสีน้ำเงิน แถบที่ 2 คือ แถบสีเขียว แถบที่ 3 คือ แถบสีเหลือง

* คือ ไม่ปรากฏแถบการเคลื่อนที่

จากตารางที่ 4.4 พบว่า เมื่อนำสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค TLC เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ และเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ ระหว่างสารที่เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส และสารที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง ได้ผลการทดลอง คือ สารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงหรือสลายตัวช้ากว่าสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยสารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่เก็บไว้ในตู้เย็นจะเห็นแถบการแยกเพียงแถบเดียว คือ แถบสีน้ำเงิน จนถึงวันที่ 4 ของการทดลองจึงเห็นแถบการแยก 2 แถบ คือ แถบสีน้ำเงิน และ แถบสีเหลือง ตามลำดับ ส่วนสารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องจะเห็นแถบการแยก 2 แถบ คือ แถบสีน้ำเงิน และแถบสีเหลือง ตามลำดับในวันที่สองของการทดลอง แสดงว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหรือการสลายตัวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์

4.4 การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีของสารฟีนาซีน

4.4.1 การศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์

จากการศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงิน ทำการทดลองศึกษาลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ pH = 2 4 6 7 8 10 และ 11 ต่อเนื่องเป็นเวลา 15 วัน โดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.1-4.8

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงิน ที่ pH = 2 4 6 7 8 10 และ 11 ตามลำดับ โดยทำการทดลองเป็นเวลา 15 วัน

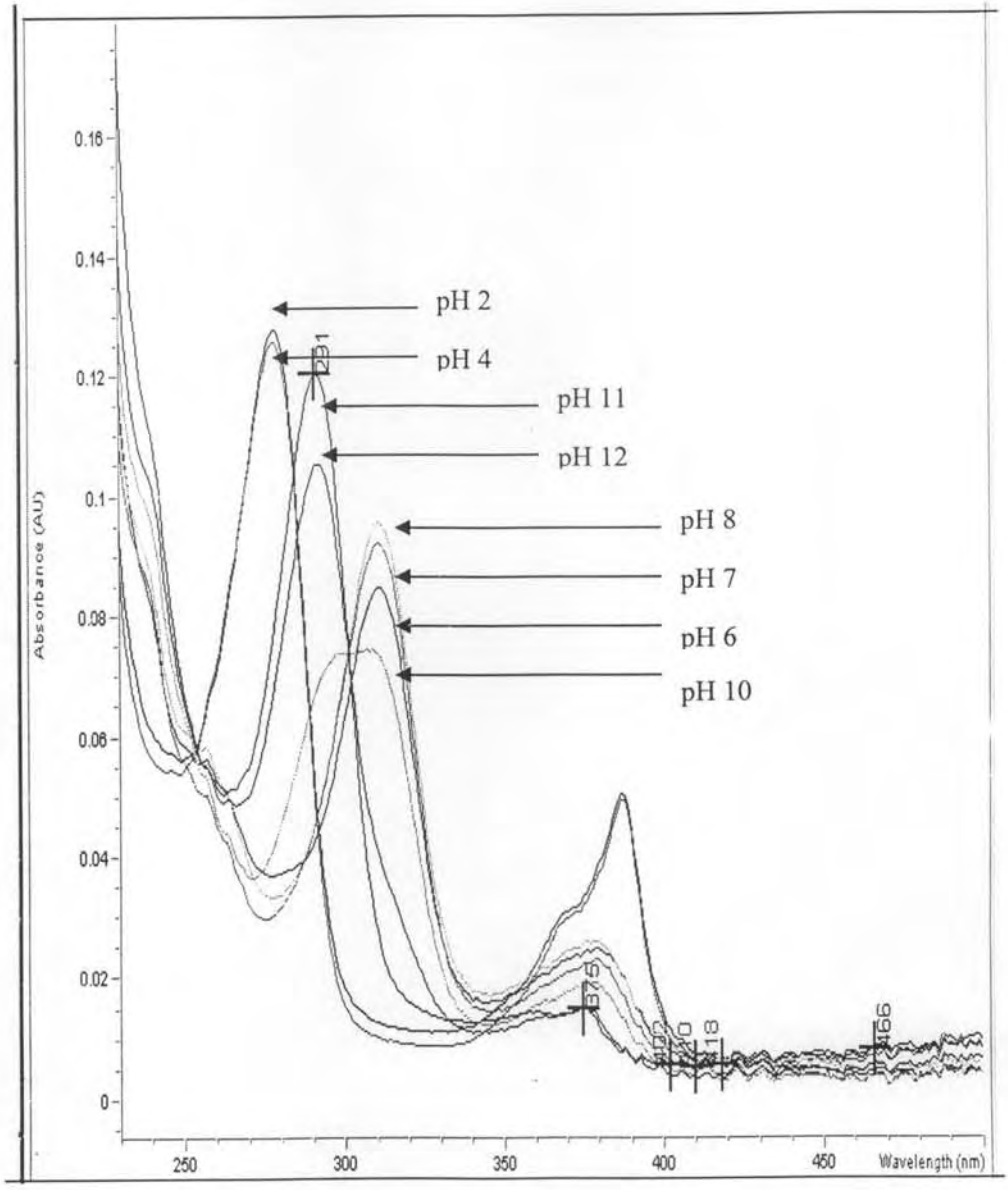
pH	เวลาทดลอง (วัน)	λ_{max}(nm) การทดลองครั้งที่ 1	λ_{max}(nm) การทดลองครั้งที่ 2
2	1	278	278
	3	278	278
	5	278	278
	7	278	278
	9	278	278
	11	278	278
	13	278	278
	15	278	278
4	1	278	277
	3	278	278
	5	278	278
	7	278	278
	9	278	278
	11	278	278
	13	278	278
	15	278	278
	1	311	311
	3	311	311

6	5	311	311
	7	311	311
	9	311	311
	11	311	311
	13	311	311
	15	311	311
7	1	311	311
	3	311	311
	5	311	311
	7	311	311
	9	311	311
	11	311	311
	13	311	311
	15	311	311
8	1	311	311
	3	311	311
	5	311	311
	7	311	311
	9	311	311
	11	311	311
	13	311	311
	15	311	311
10	1	307	310
	3	293	295
	5	292	293
	7	291	293
	9	291	292
	11	291	292
	13	291	292
	15	291	292

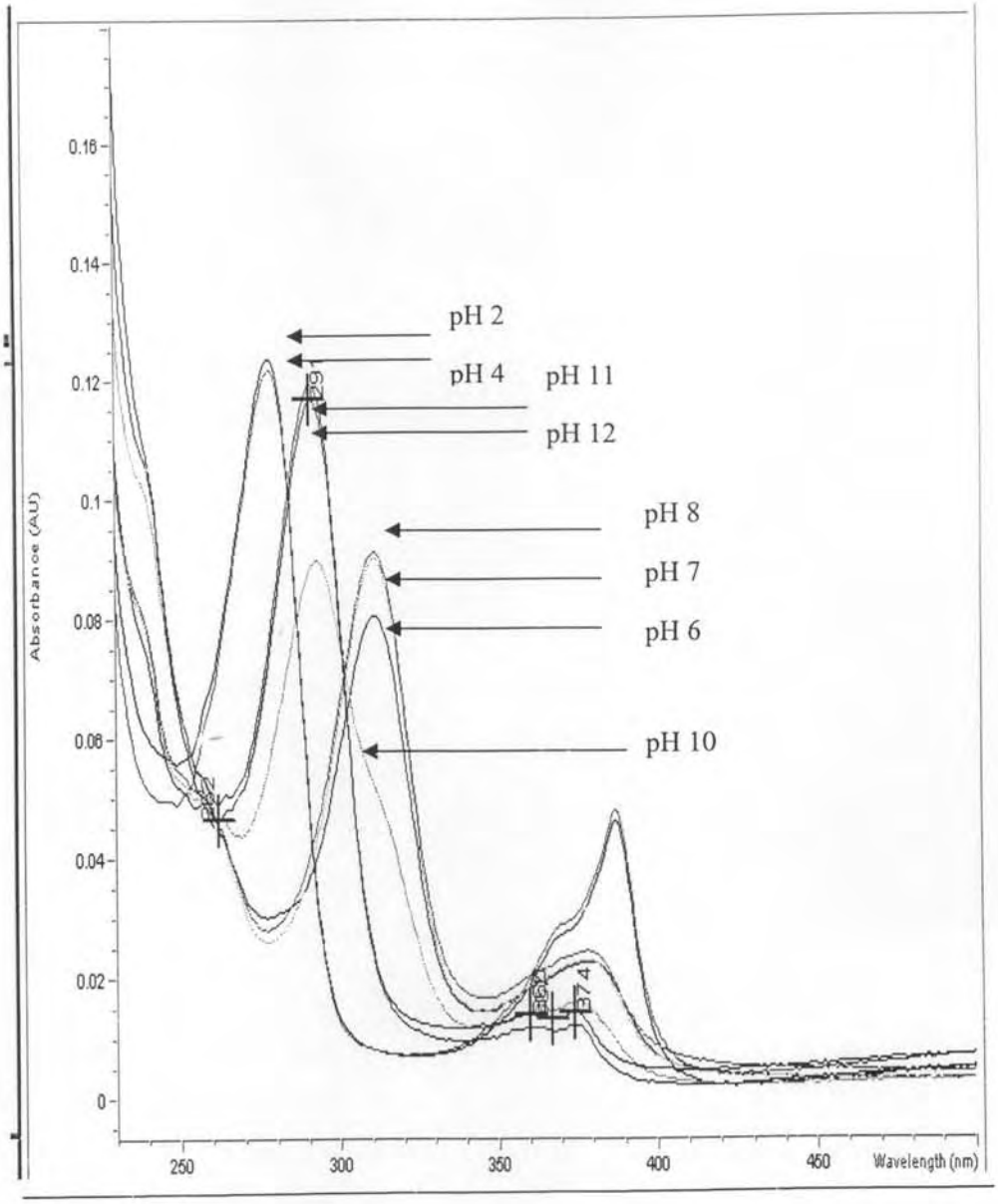
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

pH	เวลาทดลอง (วัน)	λ_{max}(nm) การทดลองครั้งที่ 1	λ_{max}(nm) การทดลองครั้งที่ 2
11	1	292	291
	3	291	291
	5	291	291
	7	291	291
	9	291	291
	11	291	291
	13	291	291
	15	291	291

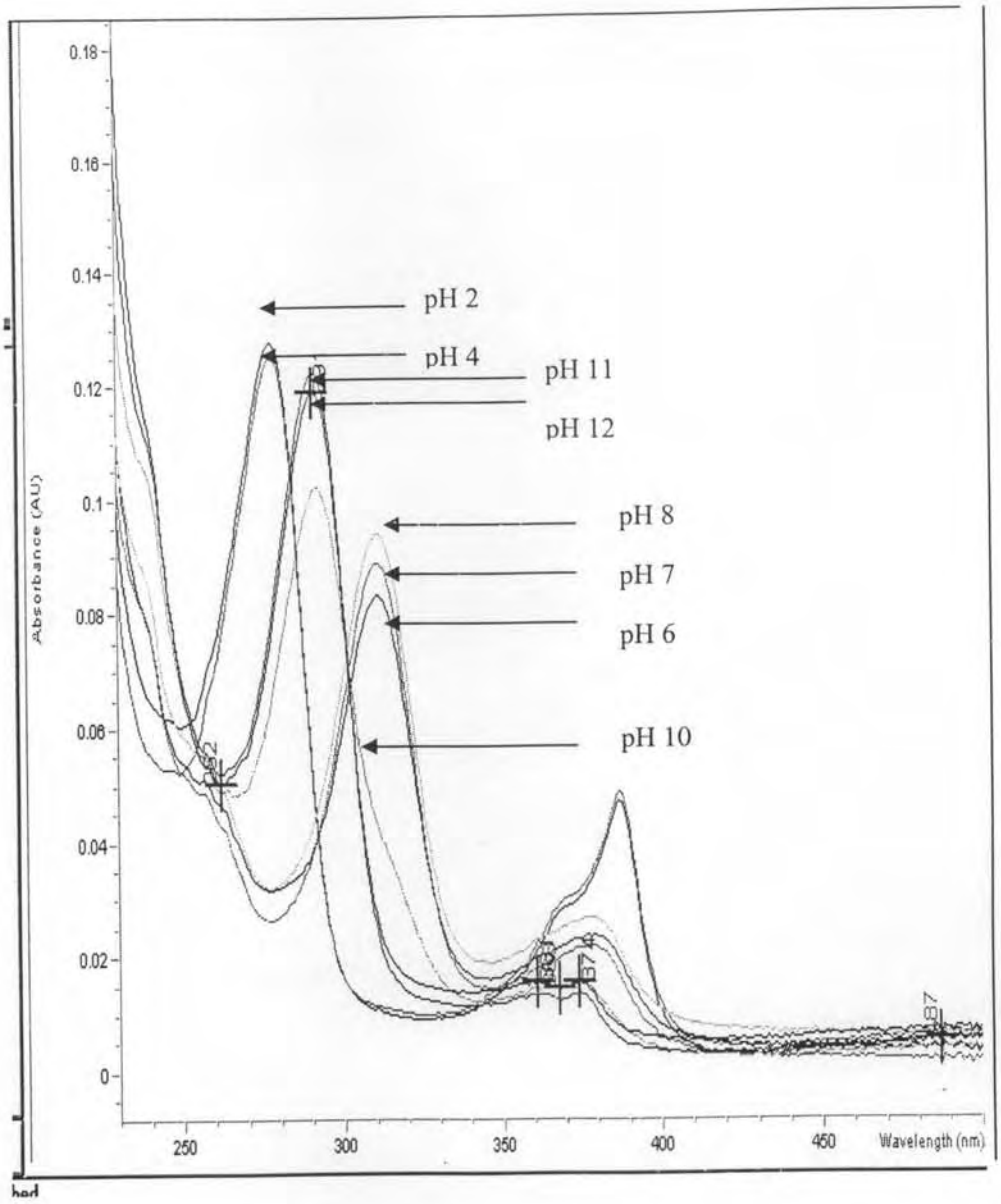
ซึ่งจากตารางที่ 4.5 พบว่า pH มีผลต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงิน ดังนี้ ในสภาวะกรด คือ ที่ pH 2 และ 4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินอยู่ที่ 278 นาโนเมตร ในสภาวะเป็นกลาง กรดอ่อน หรือด่างอ่อน คือ ที่ pH 6 7 และ 8 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินอยู่ที่ 311 นาโนเมตร ในสภาวะเบสที่ pH 11 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินอยู่ที่ 291 นาโนเมตรและพบว่าที่ pH 10 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินอยู่ที่ 307 นาโนเมตร(การทดลองครั้งที่ 1) หรือที่ 310 นาโนเมตร(การทดลองครั้งที่ 2) แต่เมื่อเวลาผ่านไปในช่วงวันที่ 3 ถึง 5 ของการทดลองสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินจะมีการเลื่อนของพีคจาก 307 นาโนเมตรไปอยู่ที่ 291 นาโนเมตร (ในการทดลองครั้งที่ 1) หรือจาก 310 นาโนเมตรไปที่ 292 นาโนเมตร(ในการทดลองครั้งที่ 2) และจากการนำสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ณ pH ต่าง ๆ วัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในช่วงความยาวคลื่น 220 – 500 นาโนเมตร ได้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงดังแสดงในรูปที่ 4.1-4.6 และสามารถเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุด กับ เวลา ในการศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีต่อสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงิน ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.7-4.8



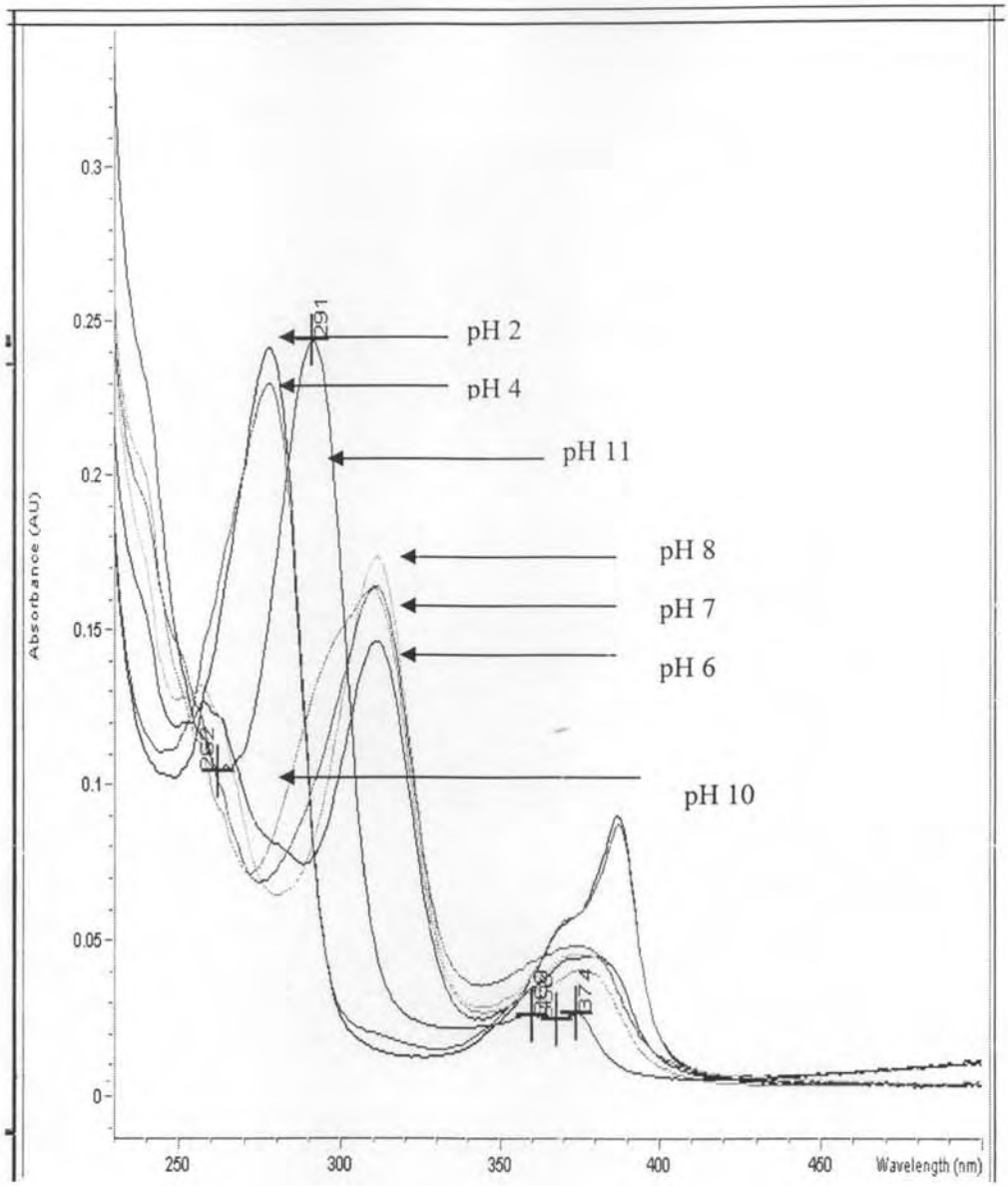
รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลองครั้งที่ 1 ที่ค่า pH ต่างๆ ในวันที่1ของการทดลอง



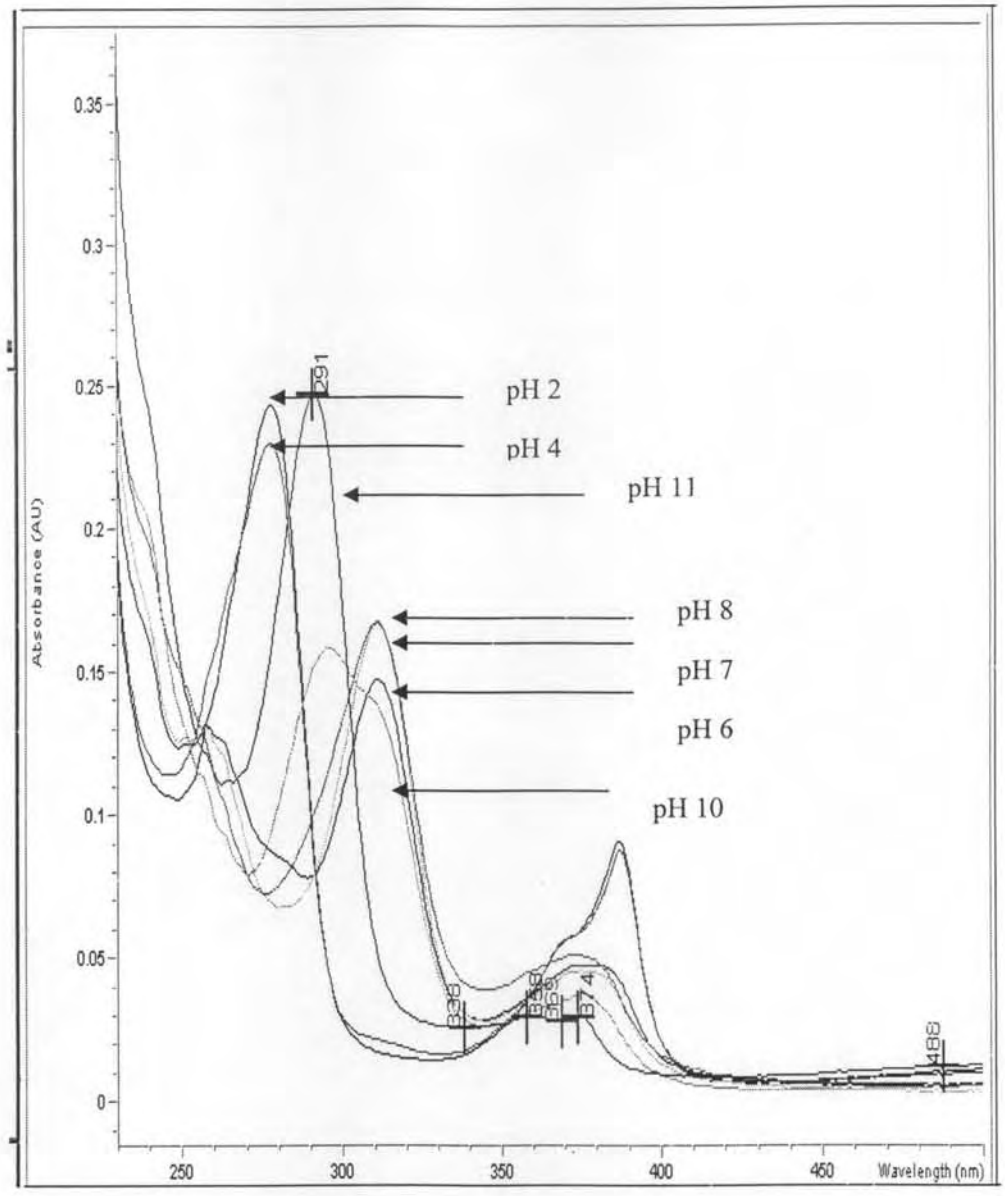
รูปที่ 4.2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลองครั้งที่ 1 ค่า pH ต่างๆ หลังจากเก็บได้ 4 วัน



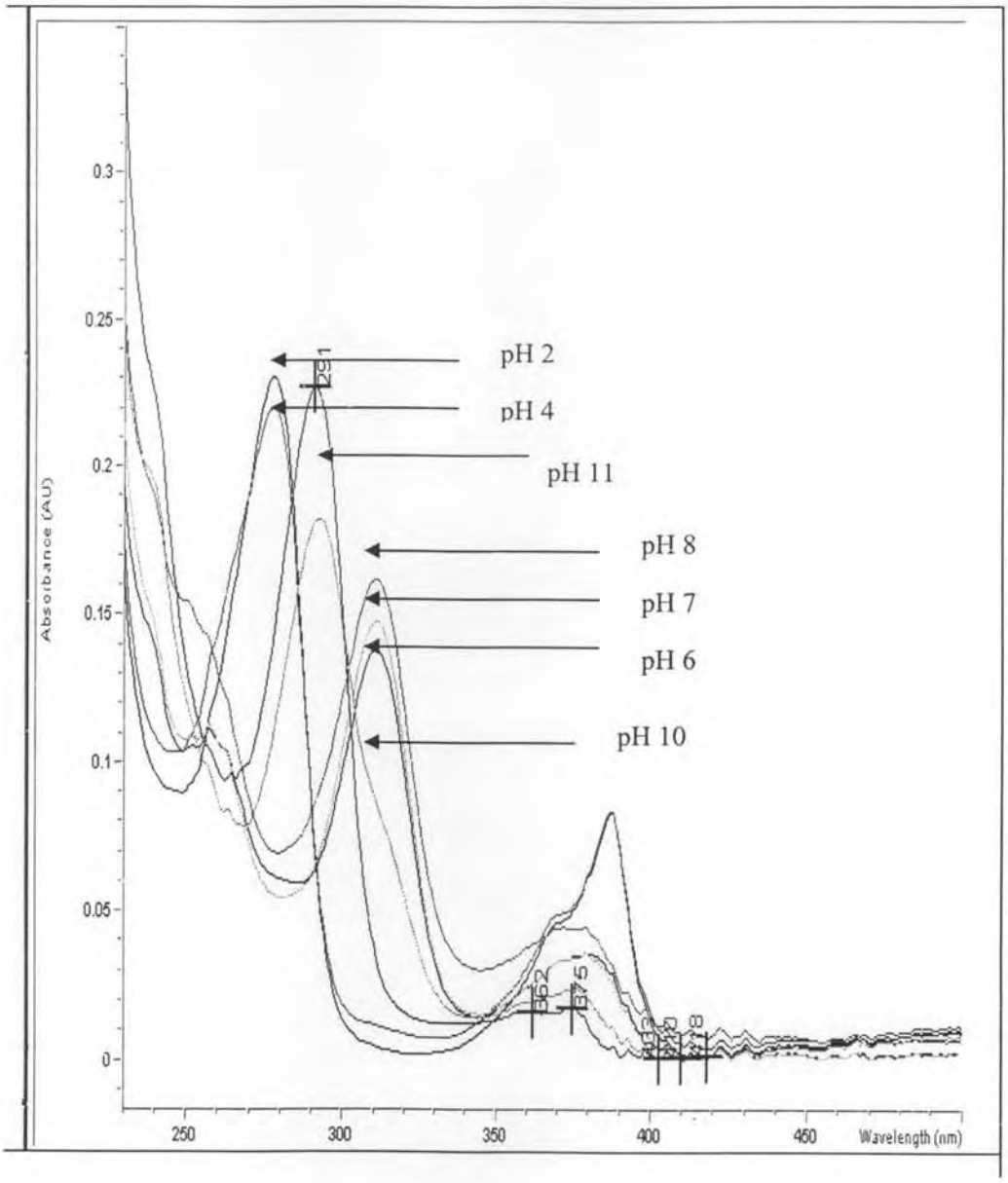
รูปที่ 4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลองครั้งที่ 1 ที่ค่า pH ต่างๆ หลังจากเก็บได้ 6 วัน



รูปที่ 4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลองครั้งที่ 2 ที่ค่า pH ต่างๆ ในวันที่ 1 ของการทดลอง

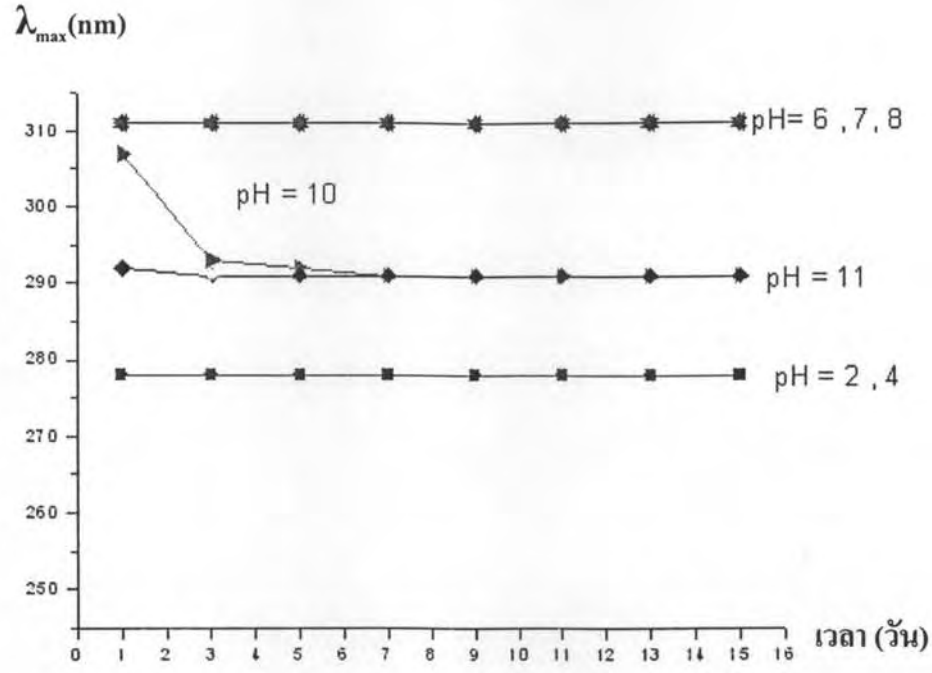


รูปที่ 4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลองครั้งที่ 2 ที่ค่า pH ต่างๆ หลังจากเก็บได้ 4 วัน

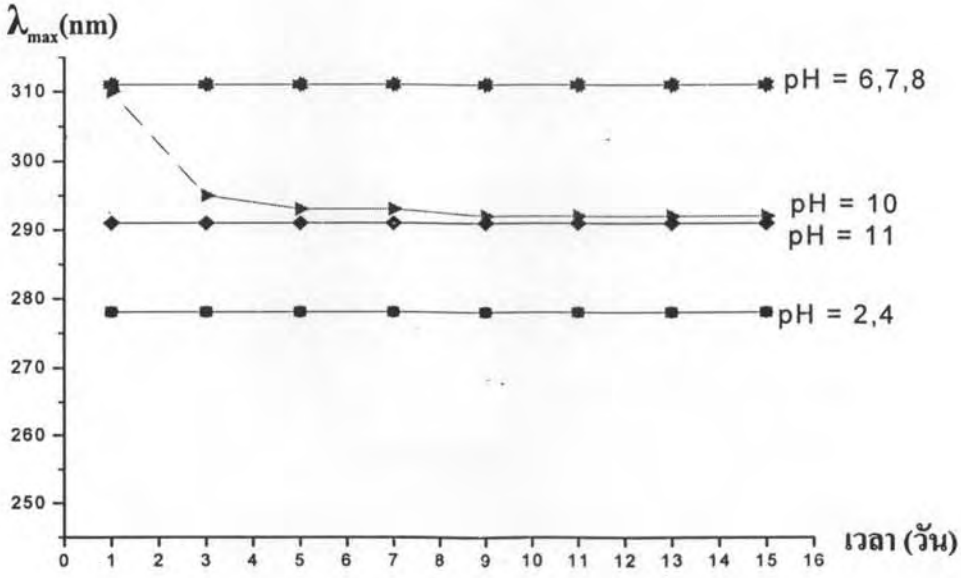


รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลองครั้งที่ 2 ที่ค่า pH ต่างๆ หลังจากเก็บได้ 10 วัน(ที่ pH 10 ค่าความยาวคลื่นสูงสุดมีการเลื่อนมาที่ 291 นาโนเมตร)

ซึ่งจากการทดลองสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดกับเวลาได้ดังนี้



รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุด กับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ pH ต่าง ๆ ในการทดลองครั้งที่ 1



รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุด กับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ pH ต่าง ๆ ในการทดลองครั้งที่ 2

4.4.2 การศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว

ทำการศึกษาอิทธิพลของแสงต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีน โดยนำสารละลายฟีนาซีนบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4} โมลาร์ และที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.45×10^{-4} โมลาร์ มาปรับ pH เท่ากับ 7 โดยที่สภาวะที่ศึกษาแบ่งเป็น 2 สภาวะ คือ สภาวะที่ให้แสงโดยให้แสงคงที่ 100 วัตต์ เป็นเวลาต่อเนื่อง 14 วัน และสภาวะที่ไม่ให้แสงผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.9 – 4.11

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่สภาวะได้รับแสงเปรียบเทียบกับ สภาวะไม่มีแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ความเข้มข้นเท่ากับ $0.45\text{x }10^{-4}$M และ 1.5×10^{-4}M

วันที่ทดลอง	Flask No.	ความเข้มข้น $0.45\text{x }10^{-4}$ M		ความเข้มข้น 1.5×10^{-4} M	
		λ_{max}(nm) สภาวะให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะไม่ให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะไม่ให้แสง
1	1	311	311	311	311
	2	311	311	311	311
	3	311	311	311	311
	4	311	311	311	311
2	1	252	312	312	311
	2	252	311	312	311
	3	252	311	312	311
	4	252	311	311	311
3	1	252	311	311	311
	2	252	311	252	311
	3	252	312	311	311
	4	252	311	311	311

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

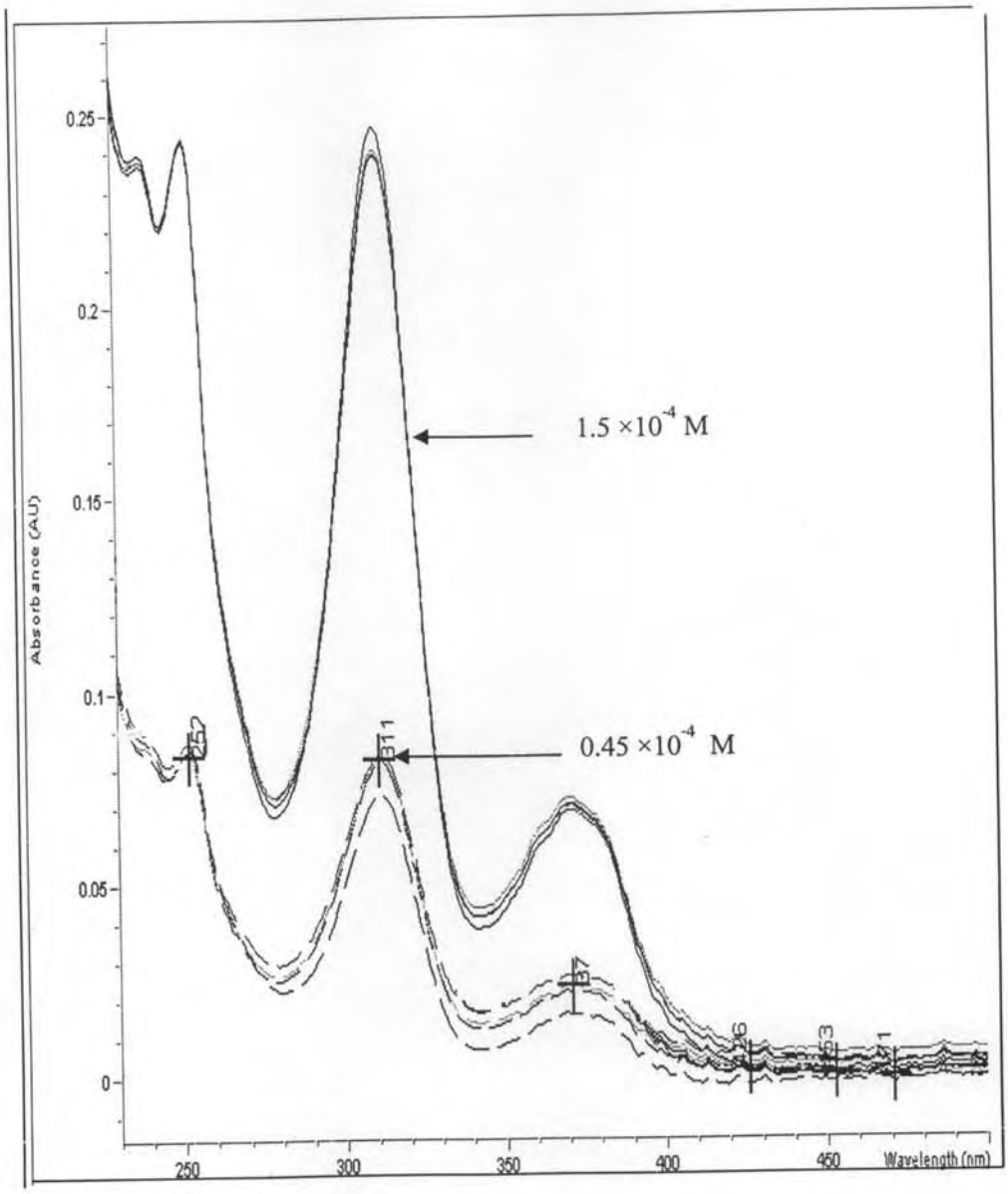
วันที่ทดลอง	Flask No.	ความเข้มข้น 0.45×10^{-4} M		ความเข้มข้น 1.5×10^{-4} M	
		λ_{max}(nm) สภาวะให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะไม่ให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะไม่ให้แสง
4	1	252	311	252	311
	2	252	311	252	311
	3	252	311	252	311
	4	252	311	252	311
5	1	252	312	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	311	252	311
	4	252	311	252	311
6	1	252	311	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	311	252	311
7	1	252	311	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	311	252	311
8	1	252	311	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	311	252	311
9	1	252	252	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	252	252	311

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

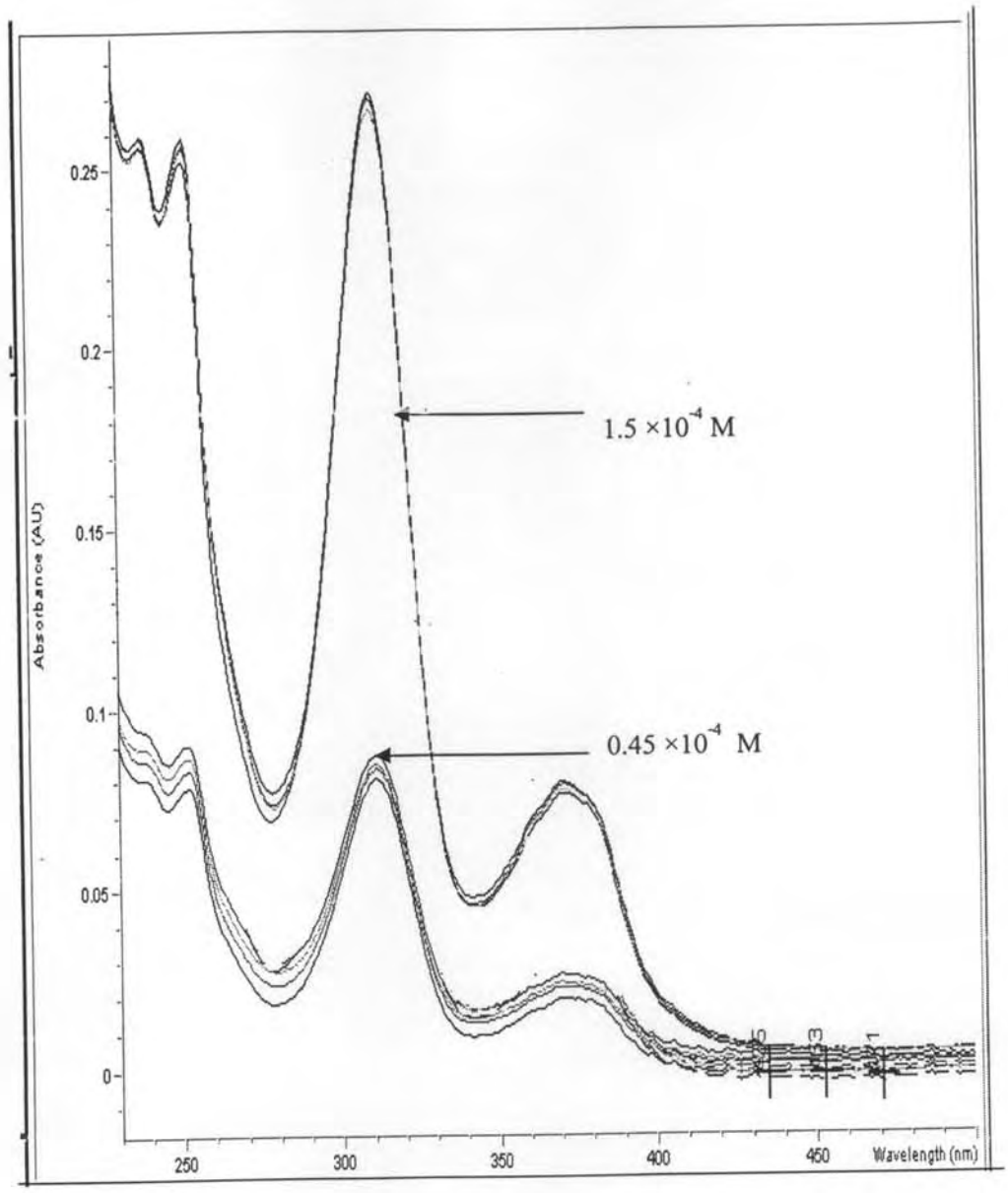
วันที่ทดลอง	Flask No.	ความเข้มข้น 0.45x 10^{-4} M		ความเข้มข้น 1.5×10^{-4} M	
		λ_{max}(nm) สภาวะให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะไม่ให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะให้แสง	λ_{max}(nm) สภาวะไม่ให้แสง
10	1	252	252	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	252	252	311
11	1	252	252	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	252	252	311
12	1	252	252	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	252	252	311
13	1	252	252	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	252	252	311
14	1	252	252	252	311
	2	252	252	252	311
	3	252	252	252	311
	4	252	252	252	311

จากตารางที่ 4.6 ซึ่งเป็นการศึกษาอิทธิพลของแสงต่อสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินโดยทำการเปรียบเทียบใน 2 สภาวะการทดลอง ได้แก่ สภาวะที่ไม่มีแสง ทำการทดลองในกล่องทึบแสง และสภาวะมีแสงโดยให้แสงคงที่ 100 วัตต์ เป็นเวลาต่อเนื่อง 14 วัน จะได้ว่าสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.45 x 10^{-4} โมลาร์ สารละลายที่ให้แสงจะมีการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุด จาก 311 นาโนเมตร ไปที่ 252 นาโนเมตร ในวันที่ 2 ของการทดลองในทุก

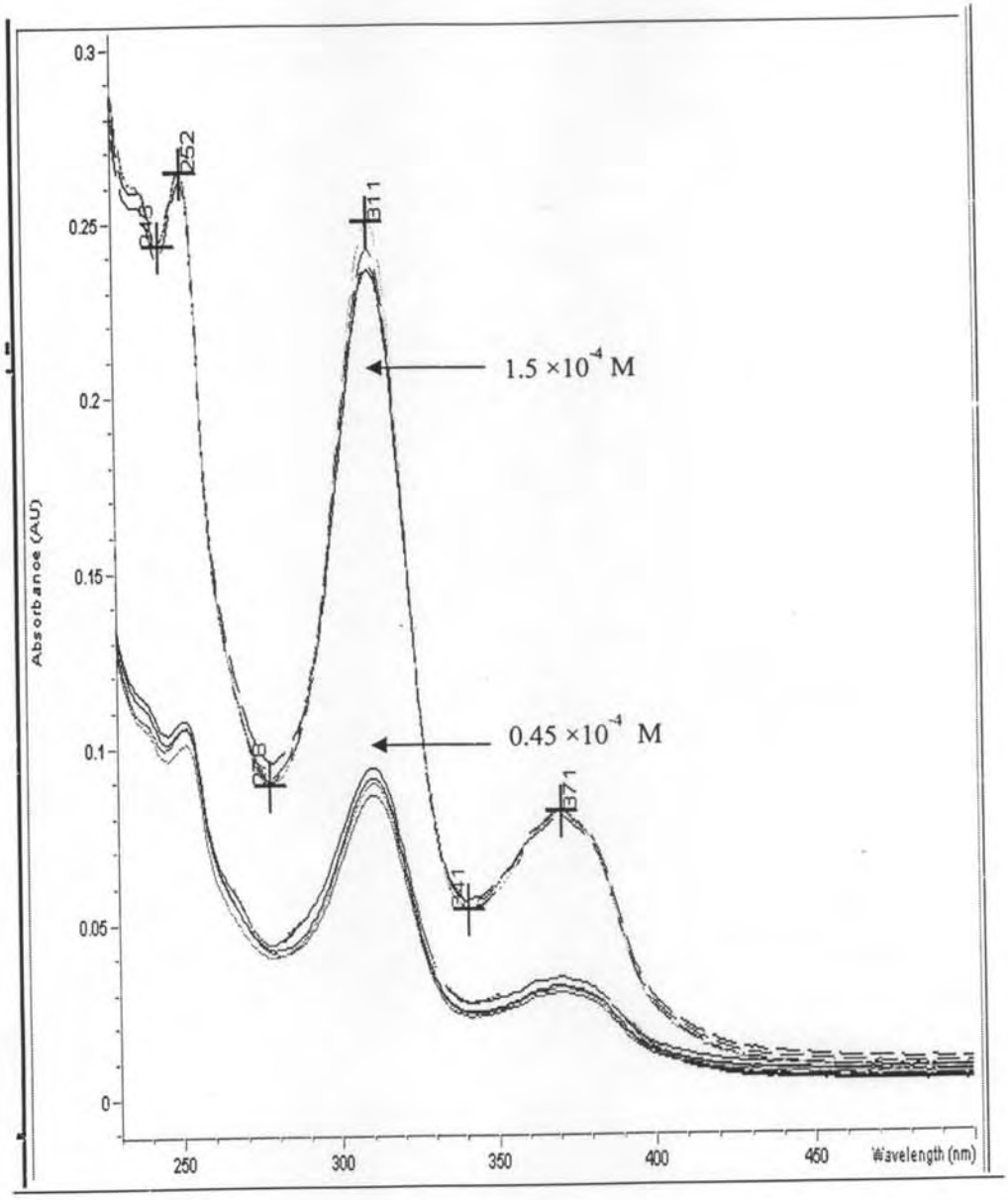
ตัวอย่าง ส่วนสารละลายที่ไม่ให้แสงจะมีการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนสูงสุด จาก 311 นาโนเมตร เลื่อนไปที่ 252 นาโนเมตร โดยเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 5 ของการทดลองในตัวอย่างที่ 2 และมีการเปลี่ยนแปลงครบทุกตัวอย่างในวันที่ 9 ของการทดลองสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่มีความเข้มข้น 1.5×10^{-4} โมลาร์ สารละลายที่ให้แสงจะมีการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุด จาก 311 นาโนเมตร ไปที่ 252 นาโนเมตร โดยเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 3 ของการทดลอง และมีการเปลี่ยนแปลงครบทุกตัวอย่างในวันที่ 4 ของการทดลอง ส่วนสารละลายที่ไม่ให้แสงจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงที่ทำการทดลอง ดังนั้นจากการทดลองสรุปได้ว่า แสงมีผลในการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ โดยแสงมีผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินมีการเปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่า สารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ไม่ให้แสง ซึ่งผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดกับเวลาของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ให้แสงและไม่ให้แสงแสดงดังกราฟที่ 4.12-4.15 และตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของการศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีต่อสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินแสดงดังรูปที่ 4.9-4.11



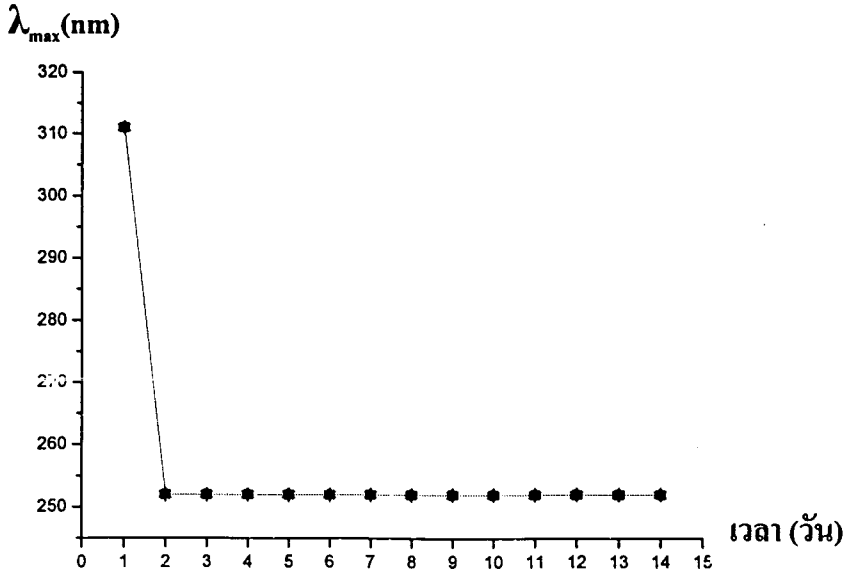
รูปที่ 4.9 ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4} M และ 0.45×10^{-4} M ที่ให้แสง ก่อนเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความยาวคลื่นสูงสุด



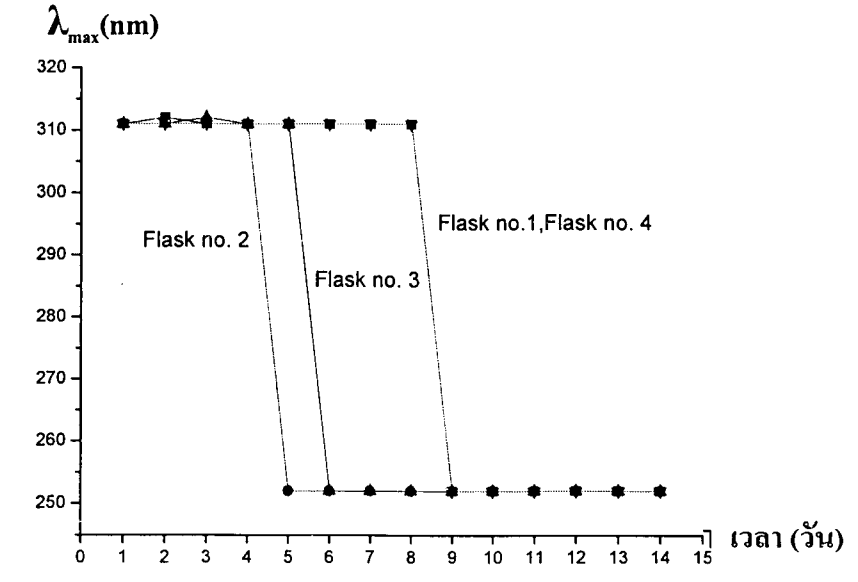
รูปที่ 4.10 ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4} Mและ 0.45×10^{-4} M ที่ไม่ให้แสง



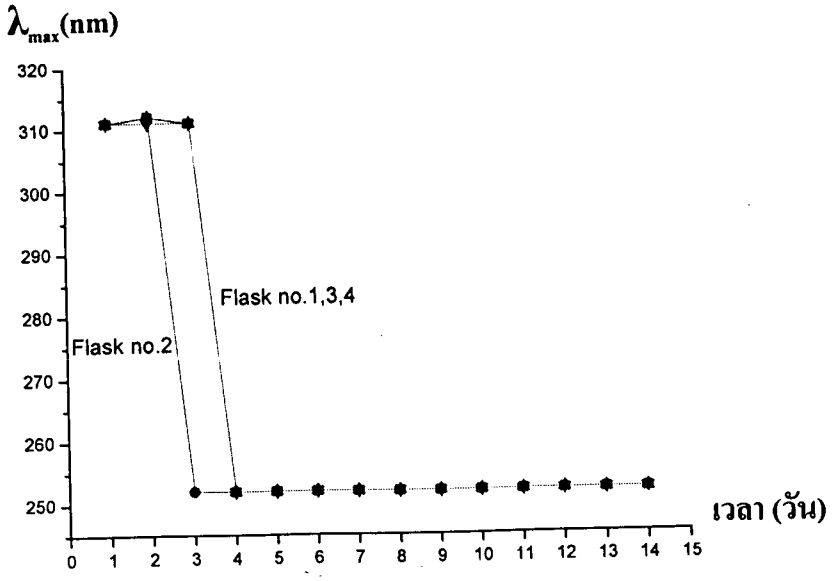
รูปที่ 4.11 ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ที่ให้แสง (หลังจากมีการเปลี่ยนแปลงค่าความยาวคลื่นสูงสุด)



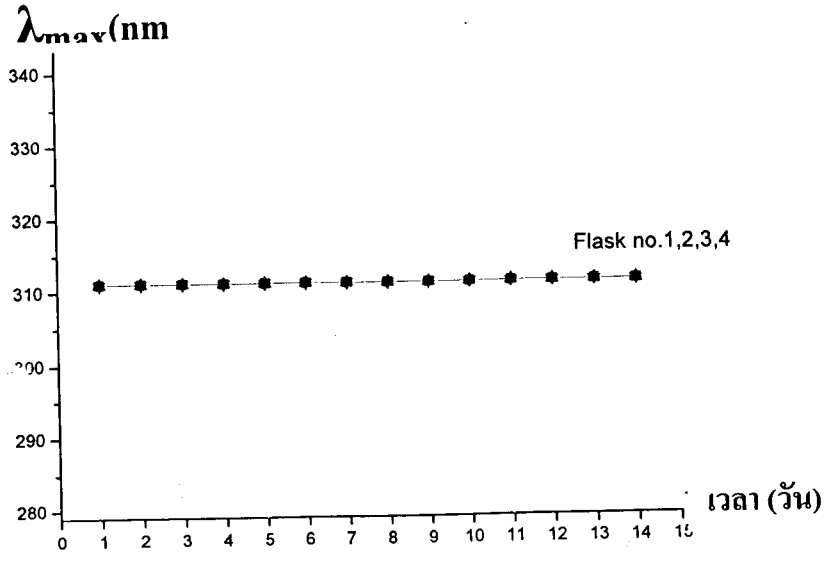
รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุด กับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.45×10^{-4}M ที่ให้แสง



รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความยาวคลื่นสูงสุด กับ เวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.45×10^{-4}M ที่ไม่ให้แสง



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุด กับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4}M *ที่ให้แสง*



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุด กับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4}M ที่ไม่ให้แสง

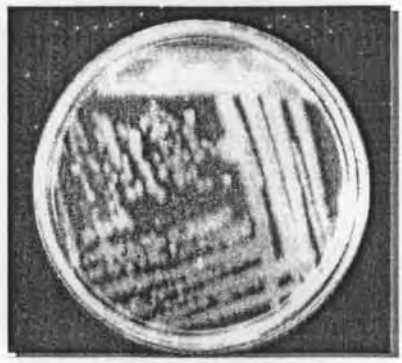
<u>หมายเหตุ</u> จากการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างไม่เป็นแนวโน้มจึงคาดว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เช่น การเบี่ยงเบนทางเคมี อุณหภูมิ เป็นต้น

โครงการย่อยที่ 2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

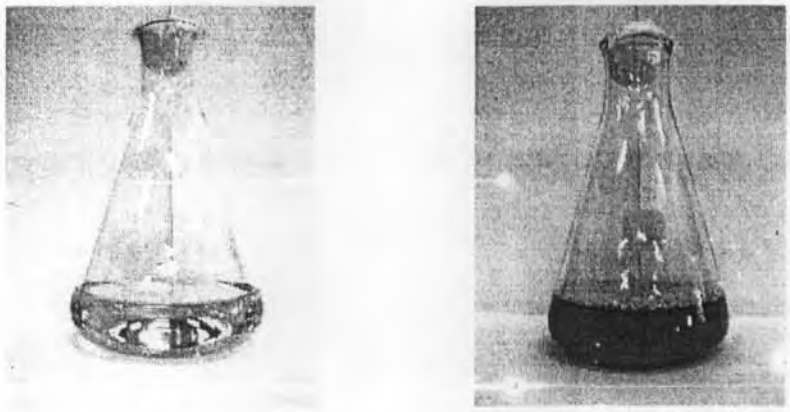
ผลการทดลอง

4.5 การผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781

ทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 จากเพลทอาหารแข็งสูตร LB (Luria-Bertani medium) ดังแสดงในรูปที่ 1.3 นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร KA (King's A medium) และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 วัน ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จะได้สารละลายสีเขียวอมน้ำเงิน แสดงว่าแบคทีเรียสามารถผลิตสารฟีนาซีนได้ เรียกสารละลายที่ได้ว่า "สารละลาย Starter" จากนั้นปิเปตลงในอาหารเหลวสูตร KA ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในอัตราส่วนของเชื้อเริ่มต้น ต่ออาหารเหลว 1 ต่อ 50 โดยปริมาตร ทำการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับแบคทีเรียโดยใช้วิธีการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน แบคทีเรียจะสามารถผลิตสารฟีนาซีนได้เต็มที่ ซึ่งสังเกตได้จากสีที่เปลี่ยนเป็นสีเขียวอมน้ำเงิน สามารถแสดงลักษณะของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิด KA และสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 วัน ได้ดังรูปที่ 1.4 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปรับค่า pH เท่ากับ 7 แล้วทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปกรองแบบลดความดันและปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารละลายซูเปอร์นาแทนต์สีเขียวอมน้ำเงิน เรียกสารละลายส่วนนี้ว่า "ซูเปอร์นาแทนต์ฟีนาซีน" จากนั้นทำการแยกสารโดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเรซินชนิด Amberlite XAD-16 resin นำสารละลายที่ได้ไปทำการลดปริมาตรด้วยเครื่อง Rotary-Vacuum Evaporator ที่อุณหภูมิไม่ควรเกิน 38 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเหลือสารละลายปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟีนาซีนในส่วนที่เรียกว่า "ครูดฟีนาซีน"



รูปที่ 4.16 ลักษณะของโคโลนีสีเหลืองของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง



(ก) (ข)

รูปที่ 4.17 รูปแสดง (ก) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด KA (ข) สารแขวนลอยแบคทีเรียสีเขียวที่ได้จากกระบวนการผลิตฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781

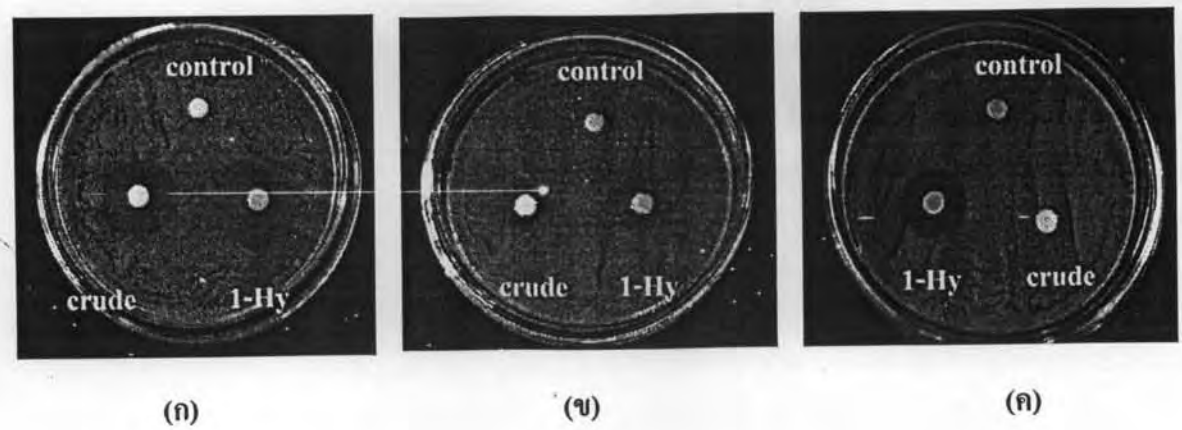
4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีน

ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของครูดฟีนาซีนและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วกับแบคทีเรียทั่วไป 3 ชนิด แบคทีเรียที่ก่อโรคพืช 6 ชนิด และเชื้อรา 1 ชนิด (ดังแสดงในตารางที่ 4.7) หลังจากทำการบ่มเพลท Bioassay ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสหรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน และทำการสังเกตและตรวจวัดโซนการยับยั้ง ได้ผลดังแสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่าทั้งครูดและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ต่าง ๆ ดังนี้คือ *Bacillus substilis*, *Staphylococus aureus*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Candida albicans* และ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* แต่ในทางกลับกันทั้งครูดและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia carotovora, Ralstonia solanacearum* และ *Pseudomonas syringae* ได้ ลักษณะของโซนการยับยั้งของครูดฟีนาซีนและสาร 1-hydroxyphenazine ต่อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบแสดงได้ดังรูปที่ 4.18

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของครูดฟีนาซีนและสาร 1-hydroxyphenazine

จุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ	โซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	ครูดฟีนาซีน (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	1-hydroxyphenazine (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
แบคทีเรียทั่วไป		
Bacillus substilis	9	11
Staphylococus aureus	17	13
Escherichia coli	23	30
แบคทีเรียที่ก่อโรคพืช		
Acidovorax avenae subsp. *citrulli*	9	9
Enterobacter aerogenes	-	-
Erwinia carotovora	-	-
Ralstonia solanacearum	-	-
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*	9	18
Pseudomonas syringae	-	-
เชื้อรา		
Candida albicans	-	20

Note: (-) ไม่มีการยับยั้ง



(ก) (ข) (ค)

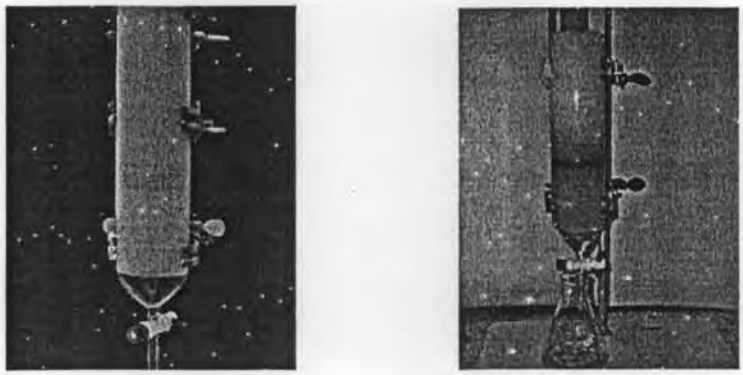
รูปที่ 4.18 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของครูดฟีนาซีนและ 1-hydroxyphenazine ต่อจุลินทรีย์บางชนิด (ก) *Escherichia coli* (ข) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (ค) *Candida albicans*

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า 1-hydroxyphenazine ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคพืช ได้แก่ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค fruit rot ในแตงกวาและโรค leaf spot ในพริก ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษานี้จะได้ว่า 1-hydroxyphenazine อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรต่อไปในอนาคต นอกจากนั้น 1-hydroxyphenazine ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิด *Candida albicans* ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค pulmonary candidiasis ในคนได้เช่นกัน สารอนุพันธ์ฟีนาซีนชนิดนี้ก็น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในทางการแพทย์ต่อไปในอนาคตเช่นกัน

โครงการย่อยที่ 3. การพัฒนาวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

4.7 การศึกษากระบวนการแยกสารฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

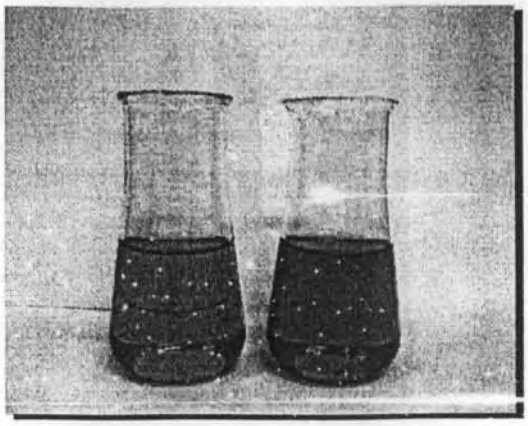
หลังจากกระบวนการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 จะได้สารแขวนลอยแบคทีเรียสีเขียวอมน้ำเงิน ทำการแยกเบื้องต้นด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุเรซินชนิด Amberlite XAD-16 [รูปที่ 4.19 (ก)] พบว่าหลังจากการชะด้วยสารผสมของ 70 % อะซิโตไนไตรล์ในน้ำ จะสามารถแยกสารที่ถูกดูดซับบน XAD เป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกมีสีน้ำตาล และส่วนที่สองมีสีน้ำเงิน ดังแสดงรูปที่ 4.6 (ข)



(ก) (ข)

รูปที่ 4.19 รูปแสดง (ก) คอลัมน์ที่บรรจุด้วยเรซินชนิด Amberlite XAD-16 (ข) สารฟีนาซีนที่ดูดซับอยู่บนเรซินชนิด Amberlite XAD-16

เก็บสารละลายที่ได้จากการชะแยกเป็นส่วน ๆ ได้สองส่วนดังแสดงในรูปที่ 4.20 คือส่วนแรกสีน้ำตาลและส่วนที่สองสีน้ำเงิน ซึ่งส่วนสีน้ำเงินจะถูกนำไปศึกษาต่อไป ซึ่งเป็นส่วนที่คาดว่าจะมีองค์ประกอบของอนุพันธ์ฟีนาซีนชนิดหนึ่งคือ ไพโอไซยานิน ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งพบว่าสารส่วนน้ำเงินให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่สอดคล้องกับสารไพโอไซยานิน ส่วนสารในส่วนสีน้ำตาลนั้นให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ไม่สอดคล้องกับอนุพันธ์ฟีนาซีน จึงไม่ได้นำไปศึกษาต่อไป นำสารละลายในส่วนสีน้ำเงินมาลดปริมาตรโดยการกลั่นแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C จนกระทั่งเหลือสารละลายปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟีนาซีนในส่วนที่เรียกว่า "ครูดฟีนาซีน" และหลังจากทำให้แห้งด้วยกระบวนการ lyophilization จะได้สารฟีนาซีนในรูปผงสีเขียวอมน้ำเงิน เก็บให้พ้นแสงโดยการเก็บในขวดที่ห่อด้วย aluminum foil และเก็บในโถดูดความชื้น



รูปที่ 4.20 สารละลายสองส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-16 ในกระบวนการแยกสารฟีนาซีน

4.8 การพัฒนากระบวนการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

4.8.1 การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุซิลิกาเจล

การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อทำการตรวจสอบ การแยกครูดฟีนาซีนด้วยเทคนิค TLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ของระบบ คือ สารละลายผสมเมทานอลกับไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด ในการแยกครูดฟีนาซีน พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการทดลอง คือ สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5โดยปริมาตร เนื่องสามารถแยกสารฟีนาซีนได้ดี และใช้เวลาในการทดลองไม่นานเกินไป โดยผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ค่า R_f และแถบที่แยกได้ของครูดฟีนาซีน ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่โดยใช้เทคนิค TLC

เฟสเคลื่อนที่	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)			ระยะทางทั้งหมดที่สารเคลื่อนที่ (cm)	ค่า R_f		
	แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3
3%MeOH:97%CH_2Cl_2 โดยปริมาตร	2.1	2.4	3.6	4	0.53	0.60	0.90
	2.1	2.4	3.6	4	0.53	0.60	0.90
5%MeOH:95%CH_2Cl_2 โดยปริมาตร	2.8	3.1	3.6	4	0.70	0.78	0.90
	2.8	3.1	3.6	4	0.70	0.78	0.90
10%MeOH:90%CH_2Cl_2 โดยปริมาตร	2.7	2.9	3.5	4	0.68	0.73	0.88
	2.7	2.9	3.5	4	0.68	0.73	0.88

จากการแยกสารฟีนาซีนด้วยเทคนิค TLC โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกัน 3 อัตราส่วน พบว่า เกิดแถบการแยก 3 แถบ ได้แก่ แถบที่ 1 คือ แถบสีน้ำเงิน แถบที่ 2 คือ แถบสีเขียว และแถบที่ 3 คือ แถบสีเหลือง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5โดยปริมาตร กับอัตราส่วนอื่นๆ พบว่าสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 สามารถแยกแถบทั้ง 3 แถบ ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และใช้เวลาในการทดลองไม่นานเกินไป ส่วนสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 สามารถแยกแถบทั้ง 3 ได้ดีเช่นเดียวกัน แต่ใช้เวลาในการทดลองนานเกินไป และสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 90 ต่อ 10ใช้เวลาในการทดลองไม่นาน แต่แยกสารได้ไม่ดีเท่าที่ควร

การศึกษาสารฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

ทำการทดลองเพื่อศึกษาว่าสารฟีนาซีนสีน้ำเงินหลังการทำบริสุทธิ์เมื่อทำการแยกโดยใช้เทคนิค TLC แล้วมีแถบการเคลื่อนที่เป็นอย่างไร และเมื่อเวลาผ่านไปจะมีการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนาซีนอย่างไร โดยในการทดลองได้เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนต่างๆ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ค่า R_f และลักษณะสีของแถบการเคลื่อนที่ของสารฟีนาซีนบริสุทธิ์ 3 แถบ โดยใช้เทคนิค TLC

สีสารที่สังเกตเห็นหลังการทำให้บริสุทธิ์	เฟสเคลื่อนที่	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่(cm)			ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ทั้งหมด	ค่าR_f		
		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3
สีน้ำเงิน	5%MeOH:95%CH_2Cl_2	2.7	*	3.7	4	0.68	0	0.93
		2.8	*	3.7	4	0.70	0	0.93
	7%MeOH:93% CH_2Cl_2	1.8	*	3.5	4	0.45	0	0.88
		1.9	*	3.6	4	0.48	0	0.90
	10%MeOH:90%CH_2Cl_2	2.1	*	3.5	4	0.53	0	0.88
		2.1	*	3.5	4	0.53	0	0.88
สีเขียว	5%MeOH:95%CH_2Cl_2	2.7	3	3.6	4	0.68	0.75	0.90
		2.7	3	3.5	4	0.68	0.75	0.89
	3%MeOH:97%CH_2Cl_2	2.2	2.4	3.6	4	0.55	0.6	0.9
		2.1	2.4	3.6	4	0.525	0.6	0.9
	10%MeOH:90%CH_2Cl_2	3.1	3.3	3.75	4	0.78	0.83	0.94
		3.1	3.3	3.75	4	0.78	0.83	0.94
สีเหลือง	5%MeOH:95%CH_2Cl_2	3.2	*	3.7	4	0.80	0	0.93
		3.3	*	3.7	4	0.83	0	0.93
	3%MeOH:97%CH_2Cl_2	2.4	*	2.9	4	0.60	0	0.73
		2.5	*	3	4	0.63	0	0.75
	10%MeOH:90%CH_2Cl_2	3.3	*	3.75	4	0.83	0	0.94
		3.2	*	3.7	4	0.80	0	0.93

<u>หมายเหตุ</u> แถบที่ 1 คือ แถบสีน้ำเงิน แถบที่ 2 คือ แถบสีเขียว แถบที่ 3 คือ แถบสีเหลือง

* คือ ไม่ปรากฏแถบการเคลื่อนที่

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.9 พบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนของเฟสการเคลื่อนที่ที่ต่างกัน ซึ่งให้ผลการทดลองที่ตรงกัน คือ สารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิค TLC พบว่า มีแถบการเคลื่อนที่ 2 แถบ คือ แถบสีน้ำเงิน และแถบสีเหลืองแสดงว่าสารฟีนาซีนสีน้ำเงินอาจไม่บริสุทธิ์ จึงมีแถบสีเหลืองซึ่งอาจเป็นสารฟีนาซีนสีเหลืองซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปสารฟีนาซีนสีน้ำเงินจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารฟีนาซีนสีเขียว เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิค TLC พบว่า มีแถบการเคลื่อนที่ 3 แถบ คือ แถบสีน้ำเงิน แถบสีเขียว และแถบสีเหลือง ตามลำดับ แสดงว่าสารฟีนาซีนสีเขียวอาจเกิดจากสารฟีนาซีนสีน้ำเงินมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป และเมื่อเก็บสารฟีนาซีนสีน้ำเงินจนมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารฟีนาซีนสีเหลือง เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิค TLC พบว่ามีแถบการเคลื่อนที่ 2 แถบ คือ แถบสีน้ำเงิน และแถบสีเหลือง ตามลำดับ แสดงว่าสารฟีนาซีนสีเหลืองที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินไม่บริสุทธิ์ จึงมีแถบสีน้ำเงินซึ่งอาจเป็นสารฟีนาซีนสีน้ำเงินปรากฏอยู่ และพบว่าเวลามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารฟีนาซีนสีน้ำเงิน

4.8.2 การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction)

การศึกษาหาเฟสของแข็งที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์ฟีนาซีน

ศึกษาการทำบริสุทธิ์ฟีนาซีนด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction, SPE) โดยเปรียบเทียบเฟสของแข็งในระบบ normal phase 3 ชนิด ได้แก่ คาร์ทริดชนิด Chromabond® SiOH Chromabond® NH_2 และ Chromabond® OH ซึ่งผลการศึกษาเปรียบเทียบนี้สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 4.10 จากผลการศึกษาพบว่า การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยคาร์ทริดชนิด Chromabond® SiOH สามารถแยกสารได้เป็น 3 แถบ ได้แก่ แถบสีเหลือง แถบสีเขียว-เหลือง และแถบสีน้ำเงิน เมื่อทำการชะด้วย ไดคลอโรมีเทน 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และ 10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการเก็บสารที่แยกได้เป็นส่วน ๆ และทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นของสารที่แยกได้ในแต่ละส่วนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง สำหรับการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยคาร์ทริดชนิด Chromabond® NH_2 สามารถแยกสารได้เป็น 2 แถบ ได้แก่ แถบสีเหลือง และแถบสีเขียว เมื่อชะด้วย ไดคลอโรมีเทน และ 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีแถบสีเขียวเข้มถูกดูดซับอยู่ส่วนบนของคาร์ทริดหลังจากชะด้วย 10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และสำหรับคาร์ทริดชนิดสุดท้าย คือ Chromabond® OH สามารถแยกสารได้เป็น 2 แถบ ได้แก่ แถบสีเหลือง และแถบสีเขียว เมื่อชะด้วย ไดคลอโรมีเทน และ 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ และไม่มีแถบสีใด ๆ เหลืออยู่ หลังจากชะด้วย 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้จากเฟสของแข็งแต่ละชนิด ด้วยวิธี TLC โดยใช้สารผสมของ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน (1:1) โดยปริมาตร ซึ่งพบว่า สารสีเหลือง และ สารสีน้ำเงิน ที่แยกได้จากคาร์ทริดชนิด Chromabond® SiOH ให้ผลการทดสอบด้วย TLC เป็นลักษณะจุดเดียว ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.77 และ 0.53 ตามลำดับ และสำหรับคาร์ทริดชนิดที่สอง คือ Chromabond® NH_2 ให้ผลการศึกษาคือ เฉพาะสารสี

เหลืองเท่านั้นที่ให้ผลการทดสอบด้วย TLC เป็นลักษณะจุดเดียว ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.78 ในขณะที่สารสีเขียวที่แยกได้เป็นแถบที่สองนั้นให้ผลการทดสอบ TLC เป็นแถบกว้าง ซึ่งแสดงว่าสารที่แยกได้ในส่วนนี้ไม่บริสุทธิ์ สุดท้ายคาร์ทริดชนิด Chromabond® OH ซึ่งแยกสารได้เป็นสองแถบ คือ แถบสีเหลือง และแถบสีเขียวนั้น ให้ผลการทดสอบด้วย TLC ที่เป็นแถบกว้างทั้งหมด ซึ่งแสดงว่าสารที่แยกได้ทั้งสองส่วนนั้นไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH ในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนจากแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781 เนื่องจากสามารถแยกสารซึ่งมีความบริสุทธิ์ได้มากกว่าเฟสของแข็งชนิดอื่น ๆ และสำหรับกลไกการดูดซับที่เกิดใน Chromabond® SiOH สามารถอธิบายได้ว่า เกิดจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซีบนผิวซิลิกากับหมู่ไฮดรอกซีของสารฟีนาซีน และเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างบนพื้นผิวของคาร์ทริดชนิดนี้ กับคาร์ทริดชนิดอื่นที่เป็นบอนเดตเฟส จะเห็นว่าความใกล้ของหมู่ฟังก์ชันบนผิวซิลิกาจะทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดีกว่า ดังนั้นเฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH จึงมีความเหมาะสมในการใช้แยกสารฟีนาซีน

ตารางที่ 4.10 การศึกษาหาชนิดของเฟสของแข็งที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์ฟีนาซีนด้วยวิธี SPE และ TLC

ตัวทำละลาย	ชนิดของเฟสของแข็งที่ศึกษา								
	Chromabond® SiOH			Chromabond® NH_2			Chromabond® OH		
	แถบที่แยกได้	ผล TLC	R_f	แถบที่แยกได้	ผล TLC	R_f	แถบที่แยกได้	ผล TLC	R_f
CH_2Cl_2	สีเหลือง	จุดเดียว	0.77	สีเลือง	จุดเดียว	0.78	สีเหลือง	แถบกว้าง	*
5% MeOH: CH_2Cl_2	สีเขียว-เหลือง	แถบกว้าง	*	สีเขียว	แถบกว้าง	*	สีเขียว	แถบกว้าง	*
10% MeOH: CH_2Cl_2	สีน้ำเงิน	จุดเดียว	0.53	สีเขียว**					

หมายเหตุ: CH_2Cl_2 = ไดคลอโรมีเทน

5% MeOH: CH_2Cl_2 = 5% เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน

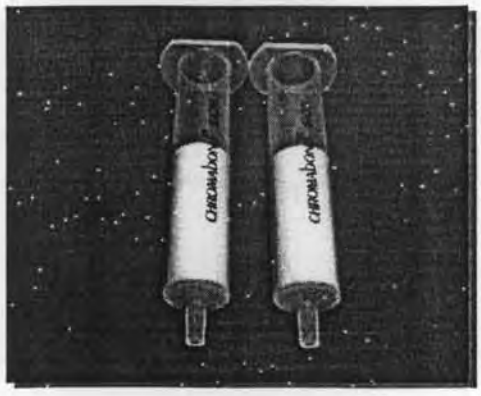
10% MeOH: CH_2Cl_2 = 10% เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน

*ไม่สามารถตรวจวัดได้

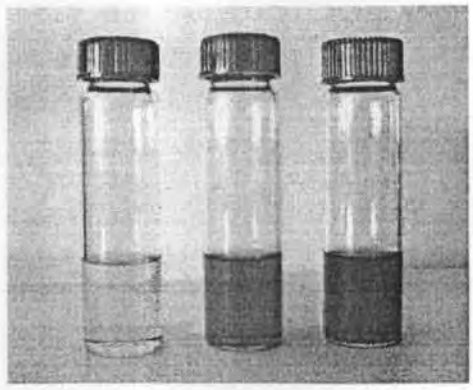
*ยังคงถูกดูดซับอยู่ส่วนบนของคอลัมน์

การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนโดยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

เมื่อได้เฟสของแข็งที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนแล้ว จะทำการนำครูดฟีนาซีนที่ได้จากกระบวนการแยกสารฟีนาซีนเบื้องต้นด้วย Amberltie XAD-16 มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ดังต่อไปนี้คือ นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ด้วยวิธีการสกัดด้วยของเหลวแล้ว มาผ่านลงในเฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH (รูปที่ 4.21) ซึ่งผ่านการปรับสภาวะด้วยไดคลอโรมีเทนแล้ว หลังจากนั้นทำการชะด้วย ไดคลอโรมีเทน 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และ 10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ จะสามารถแยกสารได้เป็นแถบสีเหลือง แถบสีเขียว-เหลือง และแถบสีน้ำเงิน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.22 หลังจากนั้นทำการเก็บสารที่แยกได้เป็นส่วน ๆ และทำการระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้การกลั่นแบบลดความดัน และตั้งทิ้งไว้จนตัวทำละลายระเหยออกหมดจนแห้ง และเก็บสารไว้ในโถดูดความชื้น ซึ่งเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้แห้งจะได้สารสีเหลืองที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม ปริมาณ 10.50 มิลลิกรัมต่อการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และได้ผลึกรูปเข็มสีน้ำเงิน ปริมาณ 12.51 มิลลิกรัมต่อการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ซึ่งปริมาณของครูดฟีนาซีน และฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วด้วยกระบวนการสกัดด้วยเฟสของแข็งแล้ว สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.11 หลังจากทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยกระบวนการสกัดด้วยเฟสของแข็งแล้ว จะทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC ต่อไป



รูปที่ 4.21 เฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH ที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.22 สารที่แยกได้จากเฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH (ก) สารสีเหลือง (ข) สารสีเขียว-เหลือง (ค) สารสีน้ำเงิน

ตารางที่ 4.11 ปริมาณของครูดฟีนาซีนและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781

สารที่แยกได้	ปริมาณที่ได้ต่อการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (มิลลิกรัม)
ครูดฟีนาซีน	1010
สารสีเหลืองที่แยกได้จาก Chromabond® SiOH	10.50
สารสีน้ำเงินที่แยกได้จาก Chromabond® SiOH	12.51

4.9 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีน

4.9.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC)

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง โดยหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบระบบตัวทำละลายดังต่อไปนี้ คือ ไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทนต่อเอทิลอะซิเตด (9:1) ไดคลอโรมีเทนต่ออะซิโทน (4:1) ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (9:1) และไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (1:1) โดยปริมาตร ซึ่งระบบตัวทำละลาย 4 ระบบแรกนั้นมีการใช้ในรายงานการวิจัยที่ผ่านมา (Gurusiddaiah et al., 1986) ซึ่งใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์ฟีนาซีนบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์ฟีนาซีนที่เฉพาะเจาะจง จึงได้มีการเปรียบเทียบกับระบบตัวทำละลายที่มีการปรับปรุงในงานวิจัยนี้คือ ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล

(1:1) โดยปริมาตร ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วย TLC พบว่า สารสีเหลืองและสารสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Chromabond® SiOH [รูปที่ 4.22 (ก) และ (ค)] ให้ผลการตรวจสอบด้วย TLC ที่เป็นลักษณะจุดเดียว เมื่อตรวจสอบกับระบบตัวทำละลายทุกระบบ ซึ่งสามารถแสดงค่า R_f ที่ได้ ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีนที่แยกได้จาก Chromabond® SiOH โดยใช้เทคนิค TLC

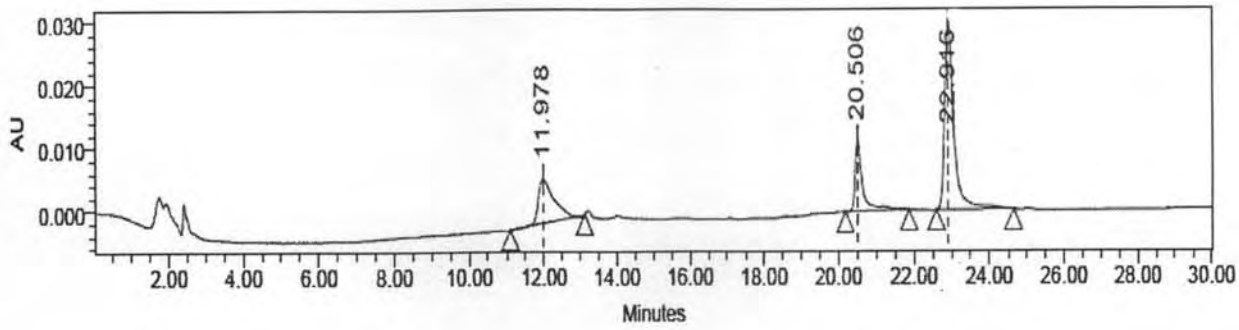
ระบบตัวทำละลาย	R_f (สารสีเหลือง)	R_f (สารสีน้ำเงิน)	เอกสารอ้างอิง
ไดคลอโรมีเทน	0.44	0.00	Gurusiddaiah et al., 1986
ไดคลอโรมีเทนต่อเอทิลอะซิเตด (9:1)	0.66	0.05	Gurusiddaiah et al., 1986
ไดคลอโรมีเทนต่ออะซิโทน (4:1)	0.68	0.05	Gurusiddaiah et al., 1986
ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (9:1)	0.70	0.49	Gurusiddaiah et al., 1986
ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (1:1)	0.77	0.53	งานวิจัยนี้

4.9.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC)

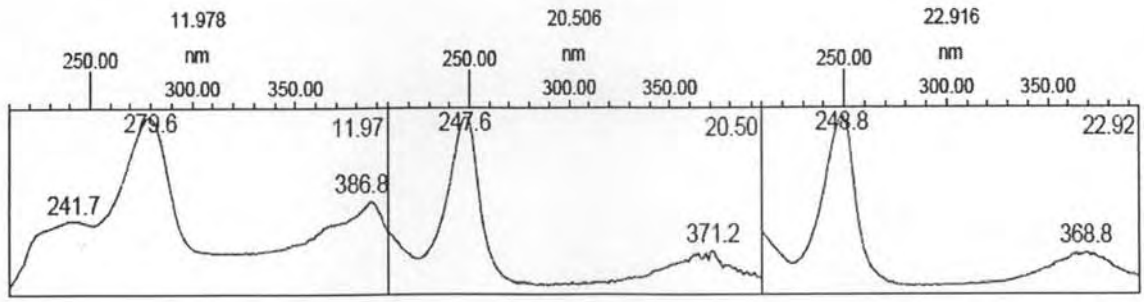
เพื่อทำการตรวจสอบชนิดของอนุพันธ์ฟีนาซีนที่มีอยู่ในครูดฟีนาซีน สามารถทำการตรวจสอบได้โดยเทคนิครีเวิร์สเฟส-โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (RP-HPLC) ผลการศึกษาแสดงได้ดังโครมาโทแกรม และยูวี-วิสิเบิล สเปกตรัมของครูดฟีนาซีนได้ดังรูปที่ 4.10 (ก) และ (ข) จากโครมาโทแกรมของครูดฟีนาซีนจะเห็นได้ว่ามีพีคทั้งหมด 3 พีคด้วยกัน นั่นคือ แบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KA จะสามารถผลิตสารฟีนาซีนได้อย่างน้อย 3 อนุพันธ์ด้วยกัน สามารถวิเคราะห์หาชนิดของอนุพันธ์ฟีนาซีนได้จากค่าเวลาการคงอยู่ในโครมาโทแกรม และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดจากสเปกตรัม จากโครมาโทแกรมในรูปที่ 4.23 (ก) สามารถแยกสารได้เป็น 3 พีค ที่ค่าเวลาการคงอยู่ 12.0, 20.5 และ 22.9 นาที ซึ่งลักษณะของ ยูวี-วิสิเบิล สเปกตราของแต่ละพีค แสดงได้ดังรูปที่ 4.23 (ข) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่สอดคล้องกับอนุพันธ์ของฟีนาซีนดังต่อไปนี้คือ พีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 279 และ 386 นาโนเมตร จะสอดคล้องกับ

อนุพันธ์ฟีนาซีนชนิด ไพโอไซยานิน พีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 247 และ 371 จะสอดคล้องกับอนุพันธ์ฟีนาซีนชนิด 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีน และพีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 248 และ 368 จะสอดคล้องกับอนุพันธ์ฟีนาซีนชนิด PCA

สารอนุพันธ์ฟีนาซีนที่แยกได้จากการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH หลังจากทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย TLC ว่ามีความบริสุทธิ์แล้ว จะทำการยืนยันความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคที่สูงขึ้นไปคือ เทคนิครีเวิร์สเฟส-โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (RP-HPLC) สามารถแสดงผลการศึกษาได้ดังโครมาโทแกรมที่ 4.11 สารสีเหลือง [รูปที่ 4.22 (ก)] ให้โครมาโทแกรมที่มีลักษณะเป็นพีคเดียวที่ค่าเวลาการคงอยู่เท่ากับ 20.4 นาที ส่วนสารสีน้ำเงิน [รูปที่ 4.22 (ค)] ให้โครมาโทแกรมที่มีลักษณะเป็นพีคเดียวที่ค่าเวลาการคงอยู่เท่ากับ 12.7 นาที ซึ่งพีคของสารทั้งสองชนิดดังกล่าวจะสอดคล้องกับพีคที่ 1 และพีคที่ 3 ของโครมาโทแกรมของครูดฟีนาซีน (รูปที่ 4.23) ดังนั้นจากผลการทดสอบด้วย TLC และ HPLC ที่สามารถยืนยันได้ว่า สารสีเหลือง และสารสีน้ำเงินที่ผ่านการแยกด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH นั้นมีความบริสุทธิ์

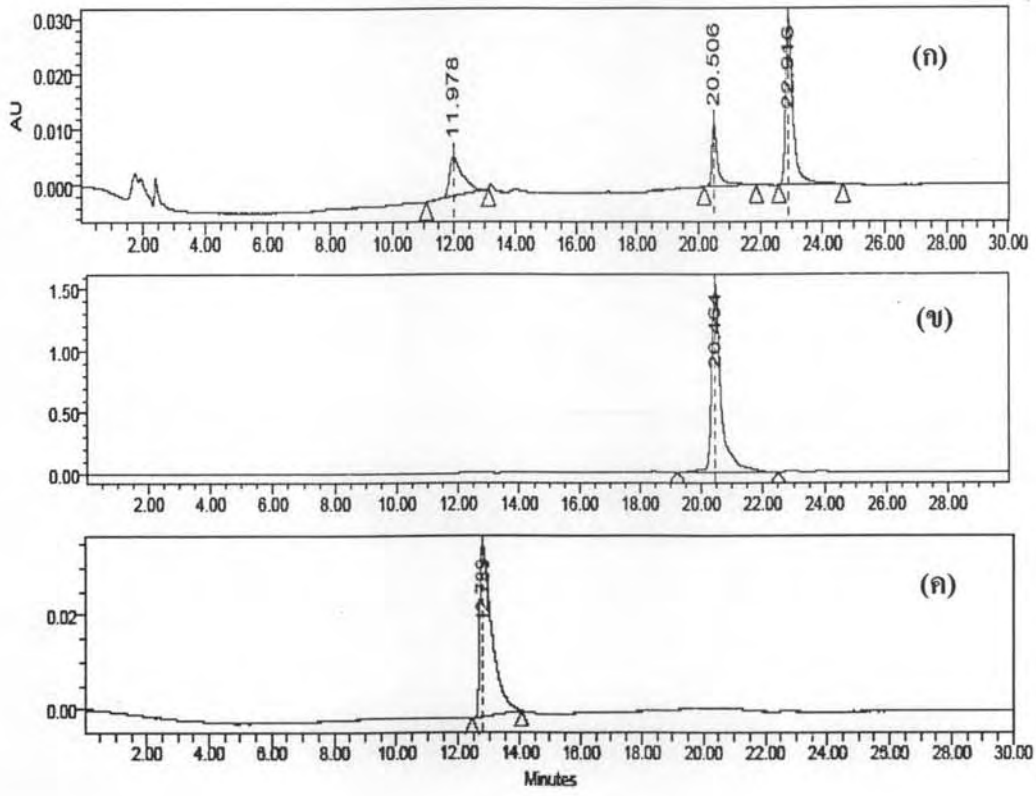


(ก)



(ข)

รูปที่ 4.23 รูปแสดง (ก) โครมาโทแกรม (ข) ยูวี-วิสิเบิล สเปกตรา ของครูดฟีนาซีนที่แยกได้จากแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781



รูปที่ 4.24 ลักษณะโครมาโทแกรมของ (ก) ครูดฟีนาซีน (ข) สารสีเหลือง (ค) สารสีน้ำเงิน ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781