บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของสารฟีนาซีนนั้น สามารถหาจุดหลอมเหลวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินและสีเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วได้ พบว่าสารฟีนาซีนสีน้ำเงินมีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับ pyocyanin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารฟีนาซีนที่มีสีน้ำเงิน และยังพบว่าจุดหลอมเหลวของสารฟีนาซีนสีเหลืองมีค่าใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของ 1-hydroxyphenazine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารฟีนาซีนที่มีสีเหลือง

ส่วนการแยกครูดฟีนาซีนด้วยเทคนิค TLC พบว่า เฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 โดยปริมาตร โดยการแยกด้วยเทคนิค TLC ยังพบว่า สารฟีนาซีนสีเหลืองที่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินไม่บริสุทธิ์ ซึ่งเวลามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนาซีนทั้งสอง และสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงหรือสลายตัวช้ากว่าสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหรือการสลายตัวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงิน นอกจากนั้น pH ยังมีผลต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินเช่นเดียวกัน ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่วัดในช่วงความยาวคลื่น 220-500 นาโนเมตร และจากการศึกษาในด้านแสงนั้น พบว่ามีผลในการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ โดยแสงมีผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินมีการเปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่าสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ไม่ให้แสง

ในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ ทั้งครูดและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วนั้น สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ ดังนี้ *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

ส่วน 1-hydroxyphenazine ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคพืช ได้แก่ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* และ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค fruit rot ในแตงกวาและโรค leaf spot ในพริกตามลำดับ การศึกษานี้พบว่า 1-hydroxyphenazine สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรต่อไปในอนาคต นอกจากนั้น 1-hydroxyphenazine ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิด *Candida albicans* ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค

การพัฒนากระบวนการแยกและการทำบริสุทธิ์ฟีนาซีน โดยนำครูดฟีนาซีนที่ได้จากกระบวนการแยกด้วยคอลัมน์ที่บรรจุเรซินชนิด Amberlite XAD-16 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อ ซึ่งกระบวนการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนนั้นสามารถทำได้หลายวิธี วิธีแรกที่ศึกษาคือ การผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ทำการทดสอบโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง เพื่อหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนพบว่า สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร เหมาะสมที่สุดในการทำบริสุทธิ์ครูดฟีนาซีน เนื่องจากสามารถแยกครูดฟีนาซีนออกจากกันได้ดี และใช้เวลาในการทดลองเหมาะสม หลังจากการผ่านครูดฟีนาซีนลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล แล้วชะด้วยสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร พบว่า สามารถแยกสารฟีนาซีนได้ 3 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่หนึ่ง มีสีเหลือง ส่วนที่สองมีสีเขียว และ ส่วนที่สามมีสีน้ำเงิน หลังจากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วยการกลั่นแบบลดความดัน ได้สารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ประมาณ 0.34 กรัม สารฟีนาซีนสีเหลืองบริสุทธิ์ประมาณ 0.07 กรัม อย่างไรก็ตามการทำบริสุทธิ์ฟีนาซีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุซิลิกาเจล ยังมีข้อเสียอยู่บ้างคือ ต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมาก เป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการพัฒนาอีกวิธีหนึ่งในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน คือการสกัดด้วยเฟสของแข็ง การศึกษาหาชนิดของเฟสของแข็งที่เหมาะสม พบว่า เฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH เหมาะสมที่สุดในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน สามารถแยกสารได้เป็นสามแถบ ได้แก่ สารสีเหลือง สารสีเขียวอมเหลือง และสารสีน้ำเงิน เมื่อทำการชะด้วย ไดคลอโรมีเทน 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และ 10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่าผลการทดสอบให้ลักษณะเป็นจุดเดียวที่ค่า R_f 0.77 สำหรับสารสีเหลือง และค่า R_f 0.53 สำหรับสารสีน้ำเงิน และเมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคที่สูงขึ้นคือ HPLC พบว่าสารสีเหลืองให้ลักษณะโครมาโทแกรมเป็นพีคเดียวที่ค่าเวลาการคงอยู่ 20.4 นาที และสารสีน้ำเงินให้ลักษณะโครมาโทแกรมเป็นพีคเดียวเช่นกันที่ค่าเวลาการคงอยู่ 12.7 นาที ดังนั้น จากวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทั้งสองวิธีพบว่า สารทั้งสองมีความบริสุทธิ์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH ในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน เนื่องจากวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งให้ข้อดีหลายประการ คือ เป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ ประหยัดตัวทำละลายที่ใช้ ทำให้ลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม