สารบัญ

	กิตติกรรมประกาศ	ก
	สารบัญ	ข
	สารบัญรูป	ง
	สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1	**บทนำ**	1
1.1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์	3
1.3	ขอบเขตการศึกษา	4
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	**ทฤษฎี**	6
2.1	ที่มาของสารฟีนาซีน	6
2.1.1	ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไปของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*	6
2.2	โครงสร้างและลักษณะทางเคมีของสารฟีนาซีน	7
2.2.1	Pyocyanin (PYO)	8
2.2.2	Phenazine-1-carboxylic acid (PCA)	9
2.2.3	1-Hydroxyphenazine	9
2.3	ความสำคัญของสารฟีนาซีน	10
2.4	การผลิตสารอนุพันธ์ของฟีนาซีน	11
2.5	การตรวจสอบสารฟีนาซีน	13
2.6	เทคนิคการแยกสารฟีนาซีน	14
2.6.1	เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption Chromatography)	14
2.6.2	เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-Exchange Chromatography)	15
2.7	การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน	15
2.8	เทคนิคการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารฟีนาซีน	16
2.9	เทคนิคสเปกโทรสโกปี	16
2.10	การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีน (Bioassay)	18

บทที่ 3	**วิธีการวิจัย**	19
	วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	19
	เครื่องมือและอุปกรณ์	19
	สารเคมี	19
	โครงการย่อยที่ 1: การศึกษาสมบัติบางประการของสารฟีนาซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*	20
3.1	การศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของสารฟีนาซีน	20
3.1.1	การหาค่าจุดหลอมเหลวของสารฟีนาซีน	20
3.1.2	การศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว	21
3.1.3	การศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว	21
3.1.4	การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสลายตัวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์	24
	โครงการย่อยที่ 2: การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*	24
3.2	การผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781	24
3.2.1	การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารฟีนาซีน	24
3.2.2	การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีน	26
	โครงการย่อยที่ 3: การพัฒนาวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน	29
3.3.1	ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย	29
3.3.2	การศึกษากระบวนการแยกสารฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี	29
3.3.3	การพัฒนากระบวนการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน	32
3.3.3.1	การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุซิลิกาเจล	32
3.3.3.2	การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction)	33
3.3.4	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีน	35
3.3.4.1	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC)	35
3.3.4.2	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC)	35

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

โครงการย่อยที่ 1: การศึกษาสมบัติบางประการของสารฟีนาซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* 38

4.1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของสารฟีนาซีน 38

4.2 การศึกษาการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน 39

4.3 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ 41

4.4 การศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีของสารฟีนาซีน 44

4.4.1 การศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ 44

4.4.2 การศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว 54

โครงการย่อยที่ 2: การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* 63

4.5 การผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 63

4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีน 64

โครงการย่อยที่ 3: การพัฒนาวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน 67

4.7 การศึกษากระบวนการแยกสารฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี 67

4.8 การพัฒนากระบวนการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน 68

4.8.1 การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุซิลิกาเจล 68

4.8.2 การทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction) 71

4.9 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีน 74

4.9.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) 74

4.9.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟีนาซีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) 75

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 79

เอกสารอ้างอิง 81

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 ภาพตัวอย่างของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* 7

รูปที่ 2.2 โครงสร้างหลักของสารฟีนาซีน 7

รูปที่ 2.3 ภาพตัวอย่างการทดลองโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง 16

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัม การดูดกลืนแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว 22

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อลักษณะสเปกตรัม การดูดกลืนแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ 23

รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสลายตัว ของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ 24

รูปที่ 3.4 กระบวนการในการผลิตสารฟีนาซีนจากแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781 26

รูปที่ 3.5 กระบวนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย ชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781 28

รูปที่ 3.6 กระบวนการในการแยกสารฟีนาซีนจากแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781 31

รูปที่ 3.7 กระบวนการในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนจากแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781 ด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง 34

รูปที่ 3.8 รูปแบบการชะในการตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีนด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง 36

รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลอง ครั้งที่ 1 ที่ค่า pH ต่างๆ ในวันที่ 1 ของการทดลอง 47

รูปที่ 4.2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลอง ครั้งที่ 1 ค่า pH ต่างๆ หลังจากเก็บได้ 4 วัน 48

รูปที่ 4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลอง ครั้งที่ 1 ที่ค่า pH ต่างๆ หลังจากเก็บได้ 6 วัน 49

รูปที่ 4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลอง ครั้งที่ 2 ที่ค่า pH ต่างๆ ในวันที่ 1 ของการทดลอง 50

รูปที่ 4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลอง ครั้งที่ 2 ที่ค่า pH ต่างๆ หลังจากเก็บได้ 4 วัน 51

รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ในการทดลองครั้งที่ 2 ที่ค่า pH ต่างๆ หลังจากเก็บได้ 10 วัน 52

รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุดกับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ pH ต่าง ๆ ในการทดลองครั้งที่ 1 53

รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุดกับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ pH ต่าง ๆ ในการทดลองครั้งที่ 2 53

รูปที่ 4.9 ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4} M และ 0.45×10^{-4} M ที่ให้แสง ก่อนเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความยาวคลื่นสูงสุด 58

รูปที่ 4.10 ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4} Mและ 0.45×10^{-4} M ที่ไม่ให้แสง 59

รูปที่ 4.11 ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ที่ให้แสง 60

รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุดกับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.45×10^{-4}M ที่ให้แสง 61

รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุดกับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.45×10^{-4}M ที่ไม่ให้แสง 61

รูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุดกับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4}Mที่ให้แสง 62

รูปที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นสูงสุดกับเวลา (วัน) ของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^{-4}M ที่ไม่ให้แสง 62

รูปที่ 4.16 ลักษณะของโคโลนีสีเหลืองของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 63

รูปที่ 4.17 รูปแสดง (ก) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด KA (ข) สารแขวนลอยแบคทีเรียสีเขียวที่ได้จากกระบวนการผลิตฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 64

รูปที่ 4.18 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของครูดฟีนาซีนและ 1-hydroxyphenazine ต่อจุลินทรีย์บางชนิด (ก) *Escherichia coli* (ข) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (ค) *Candida albicans* 66

รูปที่ 4.19 รูปแสดง (ก) คอลัมน์ที่บรรจุด้วยเรซินชนิด Amberlite XAD-16 (ข) สารฟีนาซีนที่ดูดซับอยู่บนเรซินชนิด Amberlite XAD-16 67

รูปที่ 4.20 สารละลายสองส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-16 ในกระบวนการแยกสารฟีนาซีน 68

รูปที่ 4.21 เฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH ที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 73

รูปที่ 4.22 สารที่แยกได้จากเฟสของแข็งชนิด Chromabond® SiOH (ก) สารสีเหลือง (ข) สารสีเขียว-เหลือง (ค) สารสีน้ำเงิน 74

รูปที่ 4.23 รูปแสดง (ก) โครมาโทแกรม (ข) ยูวี-วิสิเบิล สเปกตราของครูดฟีนาซีนที่แยกได้จากแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* TISTR 781 77

รูปที่ 4.24 ลักษณะโครมาโทแกรมของ (ก) ครูดฟีนาซีน (ข) สารสีเหลือง (ค) สารสีน้ำเงิน ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 78

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 สารอนุพันธุ์ของฟีนาซีนอย่างง่ายที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. 11

ตารางที่ 2.2 แสดงสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนอย่างง่ายที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. 12

ตารางที่ 2.3 แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. และอาหารที่ใช้เลี้ยงในการผลิตสารอนุพันธ์ของฟีนาซีน 12

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตฟีนาซีนจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 25

ตารางที่ 3.2 สภาวะต่าง ๆ ของเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูงในการตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีน 37

ตารางที่ 4.1 ค่าจุดหลอมเหลวของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินและสารฟีนาซีนสีเหลืองที่ได้จากการดทดลอง เปรียบเทียบกับจุดหลอมเหลวที่ได้มีการอ้างอิง 38

ตารางที่ 4.2 ค่า R_f และแถบที่แยกได้ของครูดฟีนาซีนในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่โดยใช้เทคนิค TLC 39

ตารางที่ 4.3 ค่า R_f และลักษณะสีของแถบการเคลื่อนที่ของสารฟีนาซีนบริสุทธิ์ 3 แถบ โดยใช้เทคนิค TLC 40

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า R_f ของสารฟีนาซีนสีน้ำเงินบริสุทธิ์ และแสดงลักษณะสีของแถบแยกโดยใช้เทคนิค TLC ของสารที่เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส และสารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 โดยปริมาตร 42

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ pH = 2 4 6 7 8 10 และ 11 ตามลำดับ โดยทำการทดลองเป็นเวลา 15 วัน 44

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่สภาวะได้รับแสง เปรียบเทียบกับ สภาวะไม่มีแสงของสารละลายฟีนาซีนสีน้ำเงินที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.45×10^{-4} M และ 1.5×10^{-4} M 54

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของครูดฟีนาซีนและสาร 1-hydroxyphenazine 65

ตารางที่ 4.8 ค่า R_f และแถบที่แยกได้ของครูดฟีนาซีน ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่โดยใช้เทคนิค TLC 69

ตารางที่ 4.9 ค่า R_f และลักษณะสีของแถบการเคลื่อนที่ของสารฟีนาซีน
บริสุทธิ์ 3 แถบ โดยใช้เทคนิค TLC 70
ตารางที่ 4.10 การศึกษาหาชนิดของเฟสของแข็งที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์
ฟีนาซีนด้วยวิธี SPE และ TLC 72
ตารางที่ 4.11 ปริมาณของครูดฟีนาซีนและฟีนาซีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย
P. aeruginosa TISTR 781 74
ตารางที่ 4.12 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารฟีนาซีนที่แยกได้จาก
Chromabond® SiOH โดยใช้เทคนิค TLC 75