บทที่ 3

ผลการทดลอง

จากการทดลองในบทที่ 2 สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

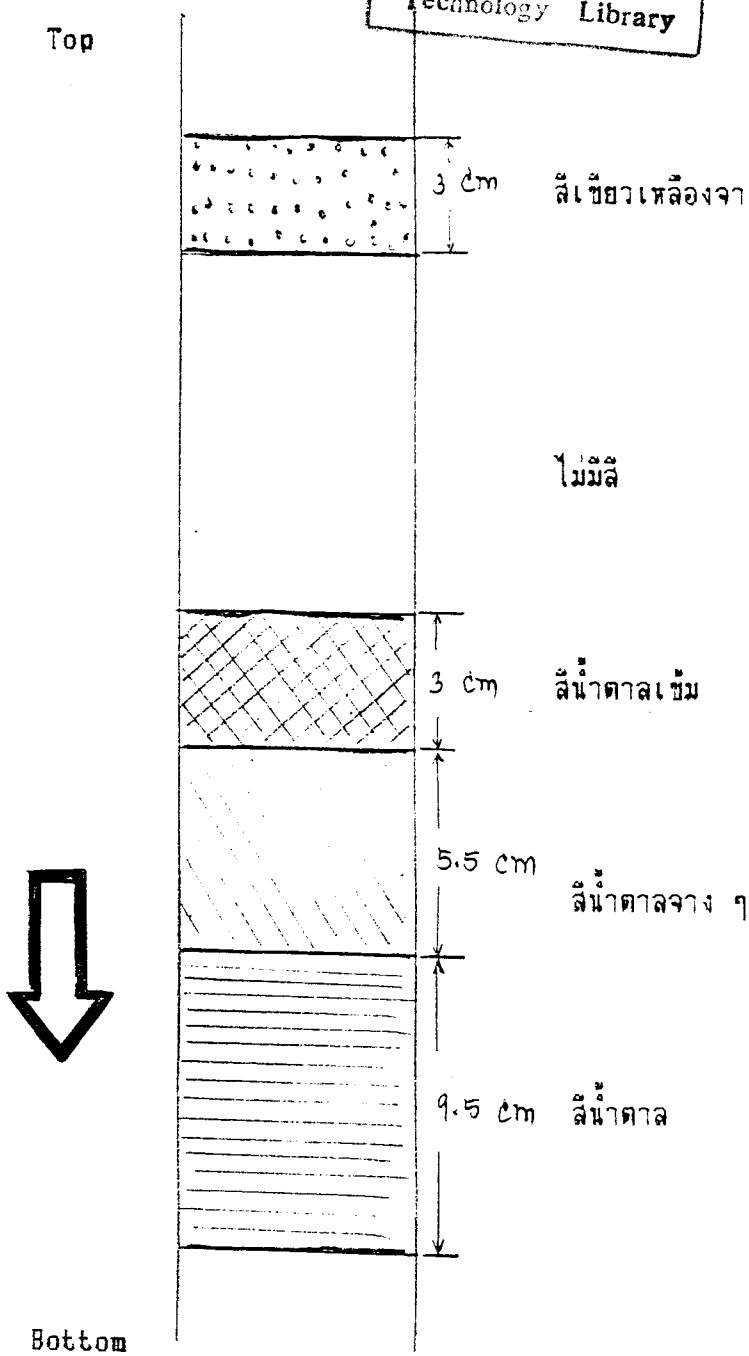
3.1 การสกัด

เมื่อนำไซเดอโรฟอร์ จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา ซึ่งเป็นสารละลายสีเขียวเหลืองภายหลังจากการเติมแอมโมเนียม เฟอร์ริก ซัลเฟต , $Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4.24H_2O$ และเฟอร์ริกไนเตรทนาโนไฮเดรท, $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ จะสังเกตเห็นได้ว่า สารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเหลือง เป็นสารละลายสีน้ำตาลแดงซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์และสารละลายจะขุ่นเนื่องจากมีตะกอนของโปรตีนที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ภายหลังจากเซนตริฟิวจ์แล้วได้สารละลายใสสีน้ำตาลแดง สกัดสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (1:1 น้ำหนัก/ปริมาตร) สารเชิงซ้อนจะละลายจากเฟสน้ำไปยังเฟสอินทรีย์ โดยสังเกตได้จากเฟสอินทรีย์จะเปลี่ยนจากสารละลายใสไม่มีสีเป็นสีน้ำตาลแดง และเฟสน้ำมีสีน้ำตาลจางลงมาก สกัดสารเชิงซ้อนกลับคืนมา ได้โดยสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์สีน้ำตาลแดงอยู่ในเฟสน้ำ เติมอีเทอร์ลงไปเพื่อกำจัดฟีนอลที่ยังเหลืออยู่ หลังจากการ lyophilization จะได้ของแข็งมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลแดงแล้วเก็บไว้ในภาชนะที่ทึบแสงและเก็บไว้ในตู้เย็นที่ -10^oC เพื่อป้องกันการสลายตัวเนื่องจากแสงและความชื้น

3.2 การแยกให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคเจลโครมาโทกราฟี

การแยกสารเชิงซ้อนไซเดอโรฟอร์โดย เจลโครมาโทกราฟี ผลการทดลองมีดังนี้ เมื่อละลายสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ใน 0.01 M pyridine ใน acetic acid (pH 6) ประมาณ 2 ml ให้มีความเข้มข้นมาก equilibrate และชะสารจากคอลัมน์ด้วย 0.01 M pyridine ใน acetic acid สารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ ที่ได้จากการสกัด จะเกิดการแยกภายในคอลัมน์ แสดงผลดังรูปที่ 3.1 หลังจากนำสารที่ผ่านคอลัมน์เก็บได้ไป Lyophilization หลังจากนั้นนำไปหาความบริสุทธิ์ ด้วย HPLC ต่อไป ซึ่งสารเชิงซ้อนไซเดอโรฟอร์หลังจาก Lyophilization แล้วจะมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล

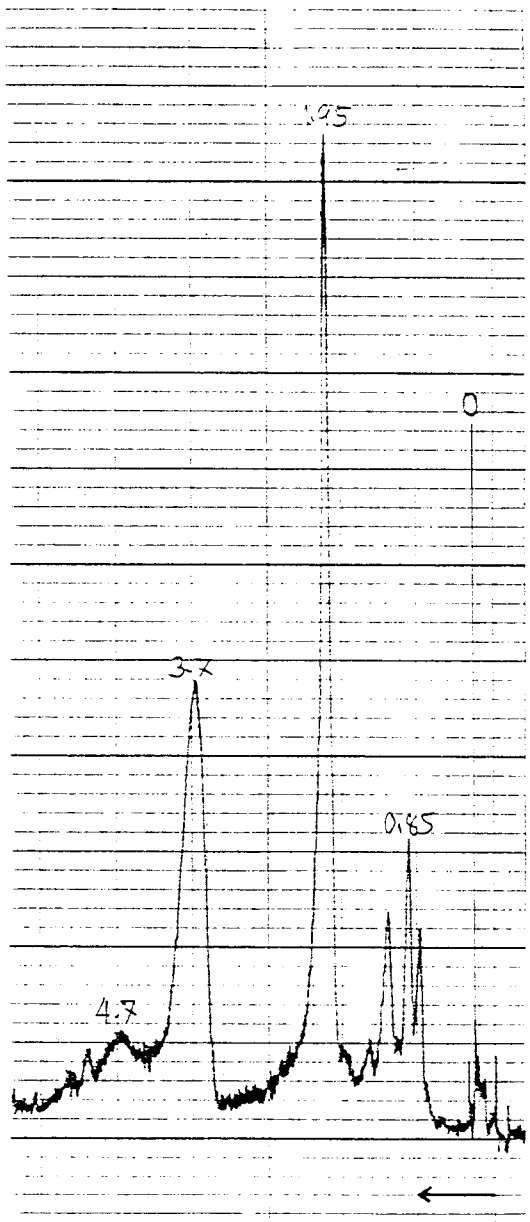
Technology Library



รูปที่ 3.1 แสดงการแยกของสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ ภายในเจลคอลัมน์

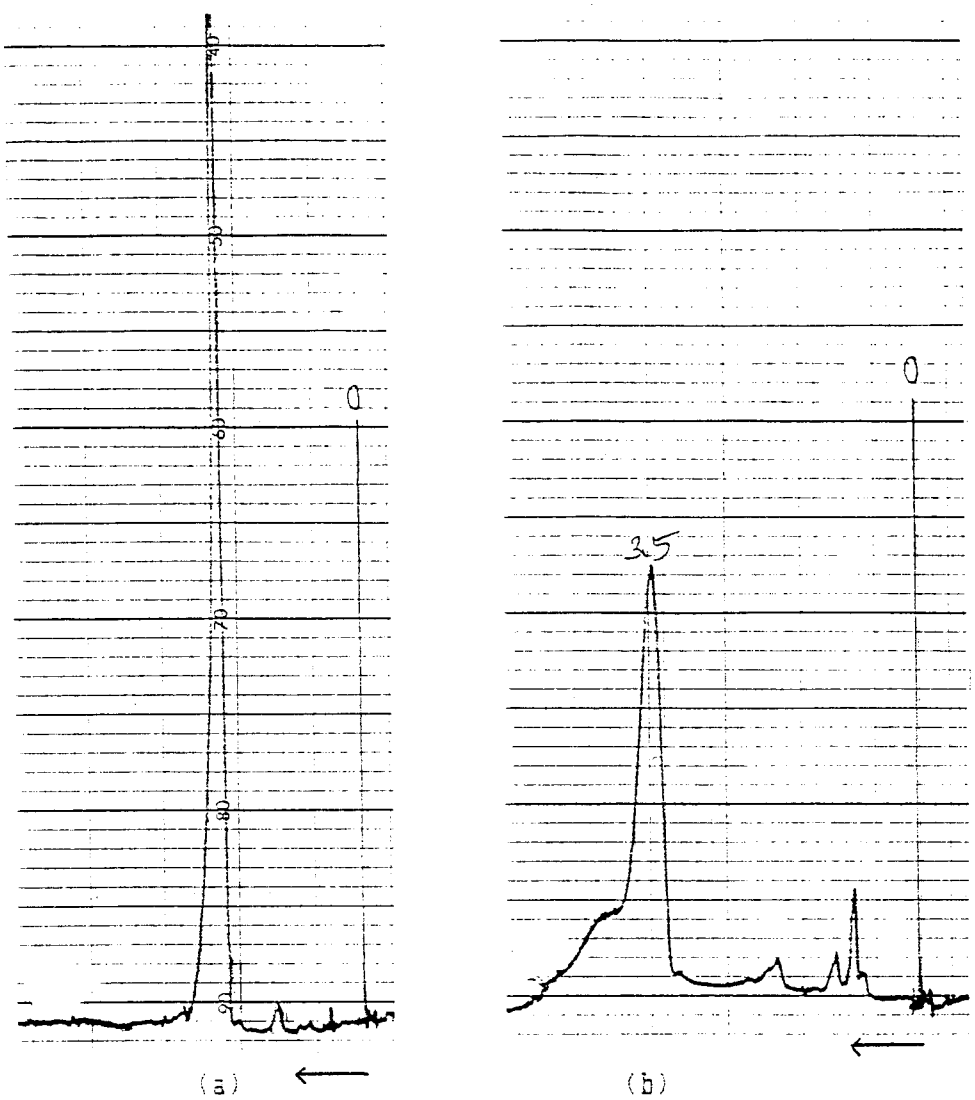
3.3 การศึกษาความบริสุทธิ์ของสารเชิงซ้อนไซเดอโรฟอร์ด้วยเครื่อง HPLC

หลังจากการนำสารเชิงซ้อนที่สกัดแล้ว มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค เจลโครมาโทกราฟี ได้ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 3.2-3.5



รูปที่ 3.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารเชิงซ้อนไซเดอโรฟอร์ที่สกัดได้โดยยังไม่ผ่านคอลัมน์เพื่อทำให้บริสุทธิ์

สภาวะ : mobile phase; Methanol : acetate Buffer (10:90), Flow rate 1 ml/min, Sample volume 10 μl, Sense 0.02



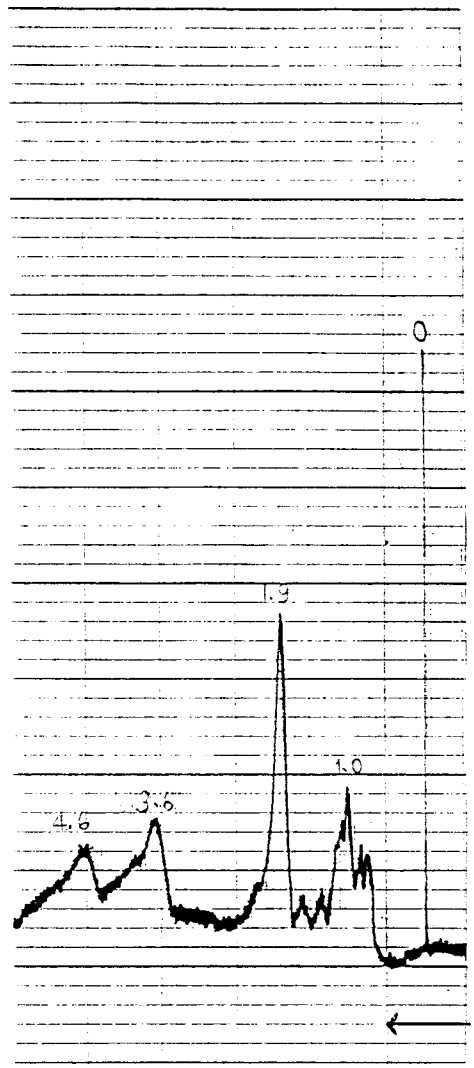
รูปที่ 3.3 แสดงการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารเชิงซ้อนไซเดอโรฟอร์

สภาวะ : mobile phase; Methanol:acetate Buffer (10:90),flow rate 1 ml/min,sample volume 10 μl, sense 0.02

a) สารเชิงซ้อนที่แยกได้ ชนิดที่ 1 (สีน้ำตาล)

b) สารเชิงซ้อนที่แยกได้ ชนิดที่ 2 (สีน้ำตาลเข้ม)

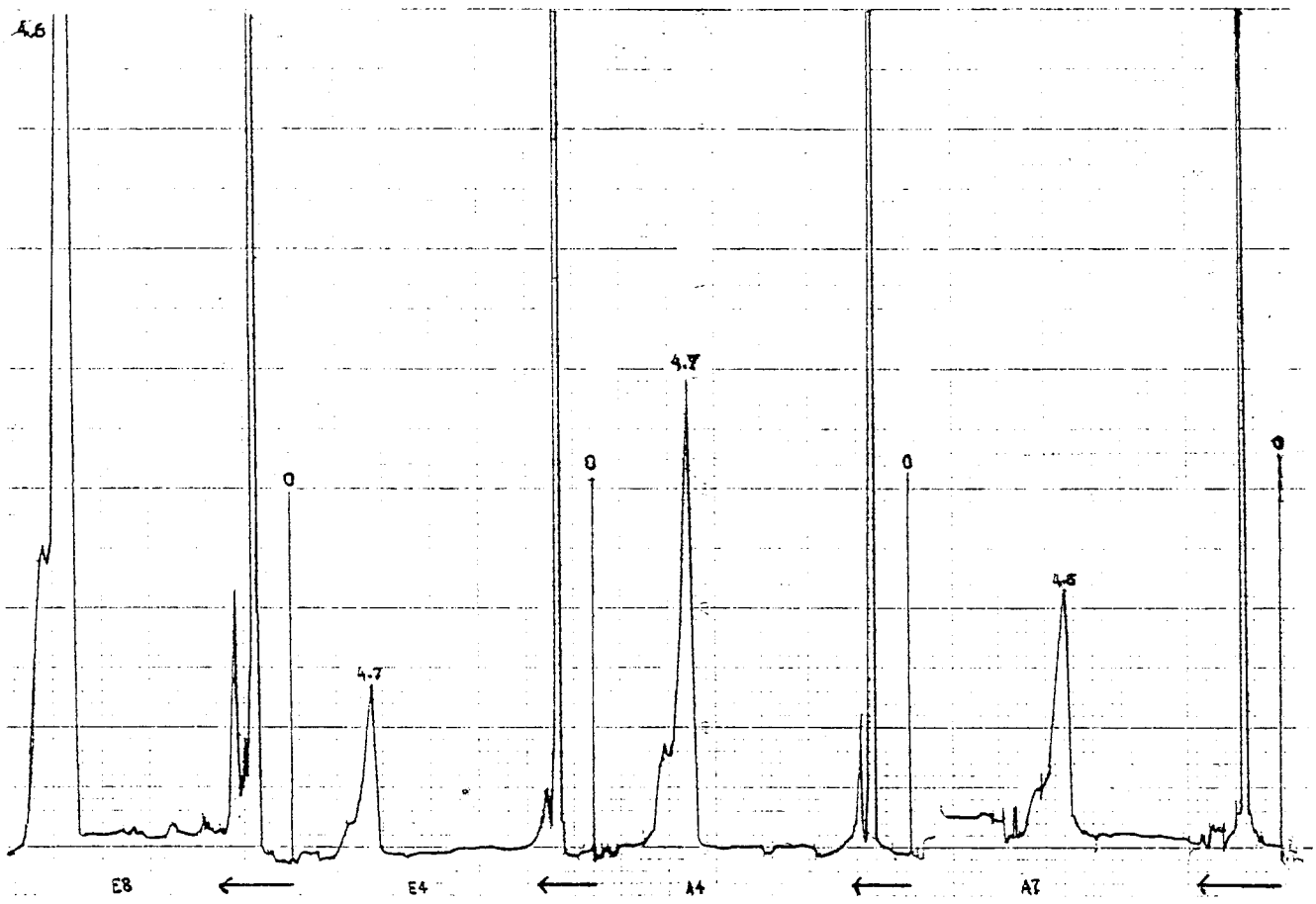
รูปที่ 3.2-3.3 แสดงการเปรียบเทียบโครมาโทแกรม ของสารเชิงซ้อนไซเดอ-โรฟอร์ ที่สกัดได้ระหว่างไซเดอโรฟอร์ชนิดที่ 1(b), ไซเดอโรฟอร์ชนิดที่ 2(c) และไซเดอโรฟอร์ที่ยังไม่ผ่านการแยกโดยเจลโครมาโทกราฟี จะเห็นได้ว่ารูปที่ 3.2 มี chromotogram เกิดขึ้นหลายตำแหน่งแต่สังเกตเห็นได้ชัดเจน ภายหลังจากทำการแยกเก็บ จะได้ไซเดอโรฟอร์ที่บริสุทธิ์แยกออกจากกัน ดังรูปที่ 3.3a และ b ซึ่งได้จากการเก็บแยกออกเป็นส่วน ๆ ดังรูปที่ 3.1 โดยสังเกตจากสีของสารบนคอลัมน์เจลโครมาโทกราฟี



รูปที่ 3.4 แสดงโครมาโทแกรมของไซเดอโรฟอร์ที่แยกออกมาช้าที่สุดในคอลัมน์

สภาวะ : mobile phase ; Methanol:Buffer (10:90), Flow rate 1 ml/min, Sample volume 10 μl, Sense 0.02

รูปที่ 3.4 เป็นโครมาโทแกรมของสารไซเดอโรฟอร์ ที่แยกออกมาช้าที่สุดในคอลัมน์มีสีเขียวเหลือง ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่มีเหล็กอยู่ในโครงสร้าง เพราะเกิดการแตกสลายของสารเชิงซ้อนไซเดอโรฟอร์ออกไป ขณะทำการแยกภายในคอลัมน์



รูปที่ 3.5 แสดงโครมาโทแกรมของไซเดอโรฟอร์ต่างชนิดกัน

สภาวะ : mobile phase Methanol:Buffer (10:90), Flow rate 1 ml/min, Sample volume 10 μl, Sense 0.01

รูปที่ 3.5 จะเห็นได้ว่า ไซเดอโรฟอร์ต่างชนิดกันที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน จะเกิดสารเชิงซ้อนในลักษณะที่แตกต่างกันและแบคทีเรียชนิดหนึ่งอาจจะสร้างไซเดอ-โรฟอร์ได้ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป โดยดูจากจำนวนโครมาโทแกรมที่เกิดขึ้น