บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดสารเชิงซ้อน เหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ด้วยสารละลาย ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (phenol/chloroform) อัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แยกสารและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลโครมาโทกราฟี คอลัมน์ K 9 บรรจุ Bio-Gel P-2 gel ชนิดละเอียดขนาด 45-90 ไมครอน สารชะ (เฟสเคลื่อนที่) 0.01 M ไพริดีนใน กรดอะซิติก (pyridine ใน acetic acid), pH 6.0 สามารถแยกสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ได้ 4 ส่วน แบ่งตามการสังเกตเห็นสีต่างกัน มีสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่งแยกออกมาก่อนสีน้ำตาล น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าและมีความบริสุทธิ์สูงมาก ชนิดที่สองสีน้ำตาลเข้ม แยกออกมาช้ากว่าชนิดแรกและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า มีความบริสุทธิ์สูงเช่นกัน เก็บไว้นาน ๆ สารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ ชนิดที่สองจะมีแนวโน้มในการเปลี่ยนไปเป็นอีกชนิดที่หนึ่ง และในขณะที่แยกด้วยเจลโครมาโทกราฟี มีเหล็กบางส่วนหลุดออกจากไซเดอโรฟอร์ จึงมีไซเดอ-โรฟอร์ที่อยู่ในรูปอิสระไม่ใช่สารเชิงซ้อน แยกออกมาลำดับสุดท้ายของการแยก นอกจากนี้ ยังทราบว่าไซเดอโรฟอร์ต่างชนิดกัน จะรวมตัวกันเป็นสารเชิงซ้อนกับเหล็กได้ในลักษณะที่ต่างกัน สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์หลังการแยกได้ด้วยเครื่อง HPLC เฟสเคลื่อนที่ เมธานอล:อะซิเตทบัฟเฟอร์ (10:90) pH 6.0 สามารถวิเคราะห์สารเชิงซ้อนเหล็กไซเดอโรฟอร์ได้ดี ชนิดแรกเกิด chromatogram ห่างจากจุดเริ่มต้น 1.95 mm ชนิดที่สองเกิด chromatogram ห่างจากจุดเริ่มต้น 3.65 mm เมื่อใช้อัตราส่วนของเมธานอลน้อยลงจะทำให้ chromatogram ที่ได้แยกออกจากกันได้ดีมากขึ้น ถ้าต้องการปรับปรุงการแยกให้ดียิ่งขึ้นกว่านี้ควรจะมีการบรรจุ Bio-Gel P-2 gel ในเจลคอลัมน์ควรบรรจุให้แน่นและเพิ่มความยาวของคอลัมน์อีก สารตัวอย่างที่ใช้ควรมีความเข้มข้นสูงอัตราเร็วในการชะสารออกจากคอลัมน์ควรมีค่าต่ำ ๆ แต่อาจจะมีข้อเสียคือใช้เวลามากขึ้น แต่ก็จะได้สารที่มีความบริสุทธิ์มาก สารเชิงซ้อนไซเดอโรฟอร์กับเหล็ก สามารถแยกออกจากกันได้ด้วย

8-ไฮดรอกซีควิโนลีน (8-hydroxyquinolene) ที่เป็น chelaling agent ตัวหนึ่ง เช่นเดียวกันซึ่งจะได้สารไซเดอโรฟอร์อิสระที่ไม่มีเหล็ก (สีเขียวเหลือง) ไซเดอ-โรฟอร์อิสระนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้และเป็นประโยชน์ต่อไปได้

นอกจากนี้ ในการสกัดไซเดอโรฟอร์สามารถใช้ เบนซิลอัลกอฮอล์ (benzyl alcohol) แทน ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (phenol chloroform) แต่ไม่ค่อยนิยม เนื่องจากมีราคาแพง การแยกไซเดอโรฟอร์ออกมา อาจใช้เทคนิค ion exchange chromatography โดยการผ่านไซเดอโรฟอร์ลงใน QAE sephadex column (chloride form) ชะด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) แล้วจึงล้างคลอไรด์ออกด้วยน้ำ หลังจากนั้นผ่านสารที่ได้ เข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุ DEAE sephadex A 25 (acetate form) ชะด้วย 0.05 M pyridine ใน acetic acid buffer pH 5.0 เพื่อจะแยกไซเดอโรฟอร์ออกมา ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถแยกไซเดอโรฟอร์ได้

การแยกและทำให้บริสุทธิ์สำหรับสารเชิงซ้อน เหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ ที่ได้ทำการศึกษานี้ มีปัญหาทำให้ไม่ได้ สารบริสุทธิ์เท่าที่ควร ควรมีวิธีการปรับปรุงวิธีการทดลองดังนี้

1. ใช้ตัวอย่างที่ฉีดเข้า gel column มีความเข้มข้นสูง ๆ ปริมาตรประมาณ 2-3 ml

2. ปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมโดยใช้อัตราการไหลที่ต่ำ ๆ

3. ควรใช้คอลัมน์ที่ยาว ซึ่งจะทำให้การแยกดีขึ้น

4. ควรบรรจุ Packing material ให้แน่นจะสามารถแยกได้ดีขึ้น

5. ต้องผ่านสารตัวอย่างที่ทำการแยก ผ่านเครื่องตรวจวัดจะสามารถเห็นการแยกได้ชัดเจนกว่า การสังเกตดูสีของสารตัวอย่าง

6. ขณะทำการทดลองควรทำการทดลองอย่างรวดเร็ว มีการปิดป้องกันแสงและอุณหภูมิต่ำ เนื่องจากไซเดอโรฟอร์สูญเสียสมบัติของมันได้ง่าย ถ้าโดนแสงสว่างและอยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง ๆ