บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมัก (culture filtrate) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *P.chrysogenum* A 88</u>

เป็นที่ยอมรับว่าเอมิลอะซิเตต (amyl acetate) เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมัก จากรายงานตั้งแต่ปี 1954 จนถึงปัจจุบัน ได้มีการใช้เอมิลอะซิเตตในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักทั้งสิ้น ทั้งนี้เนื่องจากเพนิซิลลินละลายได้ดีในเอมิลอะซิเตต มีค่าประสิทธิภาพในการกระจายตัวสูง (distribution coefficient) ละลายในน้ำได้น้อย และไม่มีพิษต่อมนุษย์ (8,9) ดังนั้น ในการทดลองนี้จะใช้เอมิลอะซิเตตเป็นสารละลายอินทรีย์ในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมัก

ในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตตในระยะแรกพบว่า หลังจากเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแยกสารจะเกิดการรวมตัวระหว่างเอมิลอะซิเตตกับน้ำหมักบางส่วน ทำให้ชั้นเอมิลอะซิเตตไม่แยกออกจากชั้นน้ำหมักชัดเจน (ตามรูปที่ 7) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ โปรตีนที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก

รูปที่ 7 การรวมตัวระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตภายหลังการสกัด

จากรายงานของ Lovens และคณะ (12) ได้มีการตกตะกอนโปรตีนในน้ำหมักก่อนการสกัดด้วยเอมิลอะซิเตต โดยใช้ 1% (น้ำหมักต่อปริมาตร) กรดแทนนิก แต่ไม่มีรายงานรายละเอียดถึงข้อดีและข้อเสียของการทดลอง ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้นำวิธีการตกตะกอนโปรตีนในน้ำหมักก่อนการสกัดมาลองใช้เพื่อลดการรวมตัวระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต

3.1.1 หาชนิดของสารที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนในน้ำหมัก

นำน้ำหมักหลังจากการกรองแยก <u>P.chrysogenum</u> A 88 ออกมาเติมสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนด้วยกัน 4 ชนิดดังนี้

1 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) กรดแทนนิก

2 80% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต

3 อะซิโตน

4 95% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เอธานอล

เมื่อตกตะกอนโปรตีนเรียบร้อยแล้ว ปั่นแยกโปรตีนออกจากน้ำหมัก นำน้ำหมักมาตรวจหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามตารางที่ 1

<u>ตารางที่ 1</u> ผลการใช้สารช่วยในการตกตะกอนโปรตีน

ชนิดของสารที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน	เปอร์เซนต์ของเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก *
1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) กรดแทนนิก	40.00
80% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต	71.17
อะซิโตน	65.33
95% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เอธานอล	64.10

จากผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าการตกตะกอนโปรตีนในน้ำหมัก มีการสูญเสียเพนิซิลลิน จี ไปในปริมาณค่อนข้างสูง จึงไม่เหมาะที่จะใช้ช่วยในการสกัดเพนิซิลลิน จี Sylvester และคณะ (9) ได้รายงานไว้ว่า ซีติลไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ สามารถช่วยลดการรวมตัวระหว่างเอมิลอะซิเตตกับน้ำหมักได้เมื่อเติมลงไปในน้ำหมักก่อนการสกัด และจากการทดลองใช้ก็ได้ผลดีดังรายงานไว้ ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงเป็นการหาปริมาณซีติลไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ที่เหมาะสม

3.1.2 ปริมาณของซีติลไตรเมตทิวแอมโมเนียมโบรไมด์ที่เหมาะสม

เติมซีติลไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ลงในน้ำหมัก ในปริมาณที่แตกต่างกันดังนี้ 0.03% , 0.05% , 0.07% และ 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำน้ำหมักไปสกัดด้วยเอมิลอะซิเตต พบว่า 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของซีติลไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ทำให้การแยกชั้นระหว่างเอมิลอะซิเตตกับน้ำหมักภายหลังการสกัดแยกจากกันได้ดี ส่วนซีติลไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ปริมาณต่ำกว่านี้ไม่สามารถช่วยแยกชั้นได้ ดังแสดงในรูปที่ 8 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จะเติม 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของซีติลไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ลงในน้ำหมักก่อนที่จะนำไปสกัด

รูปที่ 8 ลักษณะของการแยกชั้นระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต เมื่อเติมซีติลไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) 0.03% , 0.05% , 0.07% และ 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.1.3 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี

สกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักตามวิธีข้อ 2.4.1 โดยปรับ pH น้ำหมักก่อนการสกัดด้วยกรดฟอสฟอริกที่มีความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้มีค่า pH ระดับต่างๆ กัน คือ 2.0 , 2.5 ,3.0 , 3.5 และ 4.0 ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี ในชั้นเอทิลอะซิเตตที่สกัดออกมาได้ตามวิธีข้อ 2.3 ด้วย HPLC พบว่า ค่า pH 3.5 และ 4.0 ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่สกัดออกมาได้ในชั้นเอทิลอะซิเตตค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณที่ได้จากการสกัดที่ pH 2.0 , 2.5 และ 3.0 ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี

ค่าความเป็นกรดด่าง	เปอร์เซนต์ของเพนิซิลลิน จี ในเอทิลอะซิเตต*
2.0	56.20
2.5	59.41
3.0	53.90
3.5	43.20
4.0	35.16

หมายเหตุ * เทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักซึ่งกำหนดให้เป็น 100%

ดังนั้นในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ pH เวลาที่ใช้ในการสกัด อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักกับเอทิลอะซิเตต และจำนวนครั้งที่สกัด จะใช้ค่า pH 3 ค่า คือ 2.0 , 2.5 และ 3.0

ในการทดลองขั้นต่อไปจะหา ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตต โดยในการทดลองแรกจะกำหนดให้ pH คงที่ ที่ 3.0

3.1.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตต

สกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตตตามวิธีข้อ 2.4.1 โดยอัตราส่วนน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต 1:1 โดยปริมาตรแปรผันเวลาที่ใช้ 10 , 20 , 30 , และ 40 นาที พบว่า ที่เวลา 30 นาที จะได้เพนิซิลลิน จี มากกว่าที่เวลาอื่น ตามตารางที่ 3

<u>ตารางที่ 3</u> ปริมาณของเพนิซิลลิน จี ที่สกัดได้จากน้ำหมักเมื่อใช้ระยะเวลาต่างๆ

เวลาที่ใช้ (นาที)	ปริมาณเพนิซิลลิน จี * ในเอมิลอะซิเตตที่สกัดแต่ละครั้งเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมัก (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	
10	20.74	19.37	15.08	10.12	65.31
20	40.95	13.98	5.24	-**	60.17
30	53.60	18.57	3.16	-**	75.33
40	56.16	15.20	-**	-**	71.36

หมายเหตุ * เปอร์เซนต์ของเพนิซิลลิน จี ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมัก ซึ่งตั้งไว้ 100%

** ตรวจไม่พบเพนิซิลลิน จี

ในการทดลองขั้นต่อไปจะหาระยะเวลาควบคู่กับ pH ที่เหมาะสม ซึ่งอยู่ในช่วง pH ที่ต่ำ ดังนั้น ถ้าใช้เวลานานจะทำให้เพนิซิลลิน จีถูกทำลายด้วยกรด ที่เวลา 10 นาที จำนวนการสกัดหลายครั้งทำให้สิ้นเปลืองปริมาณเอมิลอะซิเตต ที่เวลา 20 นาที ถึงแม้ว่าปริมาณเพนิซิลลิน จี ไม่สูงมากนัก แต่ถ้าศึกษาที่ pH ต่ำเวลาน้อย อาจทำให้การสกัดได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี สูง ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจะเลือกใช้เวลาที่ 20 และ 30 นาที

3.1.5 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโดยมีตัวแปรร่วม 4 ตัวแปร คือ อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต ระยะเวลาที่ใช้สกัด pH ของน้ำหมัก และ จำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัด

สกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตตตามวิธีข้อ 2.4.1 โดยปรับค่า pH ของน้ำหมักก่อนการสกัดเป็น 2.0 , 2.5 และ 3.0 แปร อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตเป็น 1:1 และ 1:2 ใช้เวลาสกัด 20 และ 30 นาที จำนวนครั้งของการสกัด 1 และ 2 ครั้ง พบว่า ที่ค่า pH 3.0 อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต 1:1 เวลา 30 นาที ทำการสกัด 2 ครั้ง จะได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี ในชั้นเอมิลอะซิเตตสูงสุด คือ 72.33% ตามตารางที่ 4 ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจะเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

ตารางที่ 4 ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สกัดได้เมื่อแปรผัน อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด pH ของน้ำหมัก และจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัด

อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต	pH	ปริมาณเพนนิซิลลิน จี (%) *		ผลรวมปริมาณเพนนิซิลลิน จี (%) *
		สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	
เวลา 20 นาที				
1:1	2.0	40.16	3.8	43.96
1:2		59.48	-**	59.48
เวลา 30 นาที				
1:1	2.0	56.40	-**	56.40
1:2		64.30	-**	64.30
เวลา 20 นาที				
1:1	2.5	47.56	9.77	57.33
1:2		56.03	7.01	63.04
เวลา 30 นาที				
1:1	2.5	59.54	8.76	68.30
1:2		62.16	4.94	67.10
เวลา 20 นาที				
1:1	3.0	40.95	13.98	54.93
1:2		54.17	8.23	62.40
เวลา 30 นาที				
1:1	3.0	53.87	18.46	72.33
1:2		60.63	11.79	72.42

หมายเหตุ * ปริมาณเพนนิซิลลิน จีในเอมิลอะซิเตต โดยเทียบกับปริมาณเพนนิซิลลิน จี ในน้ำหมักที่กำหนดให้เป็น 100%

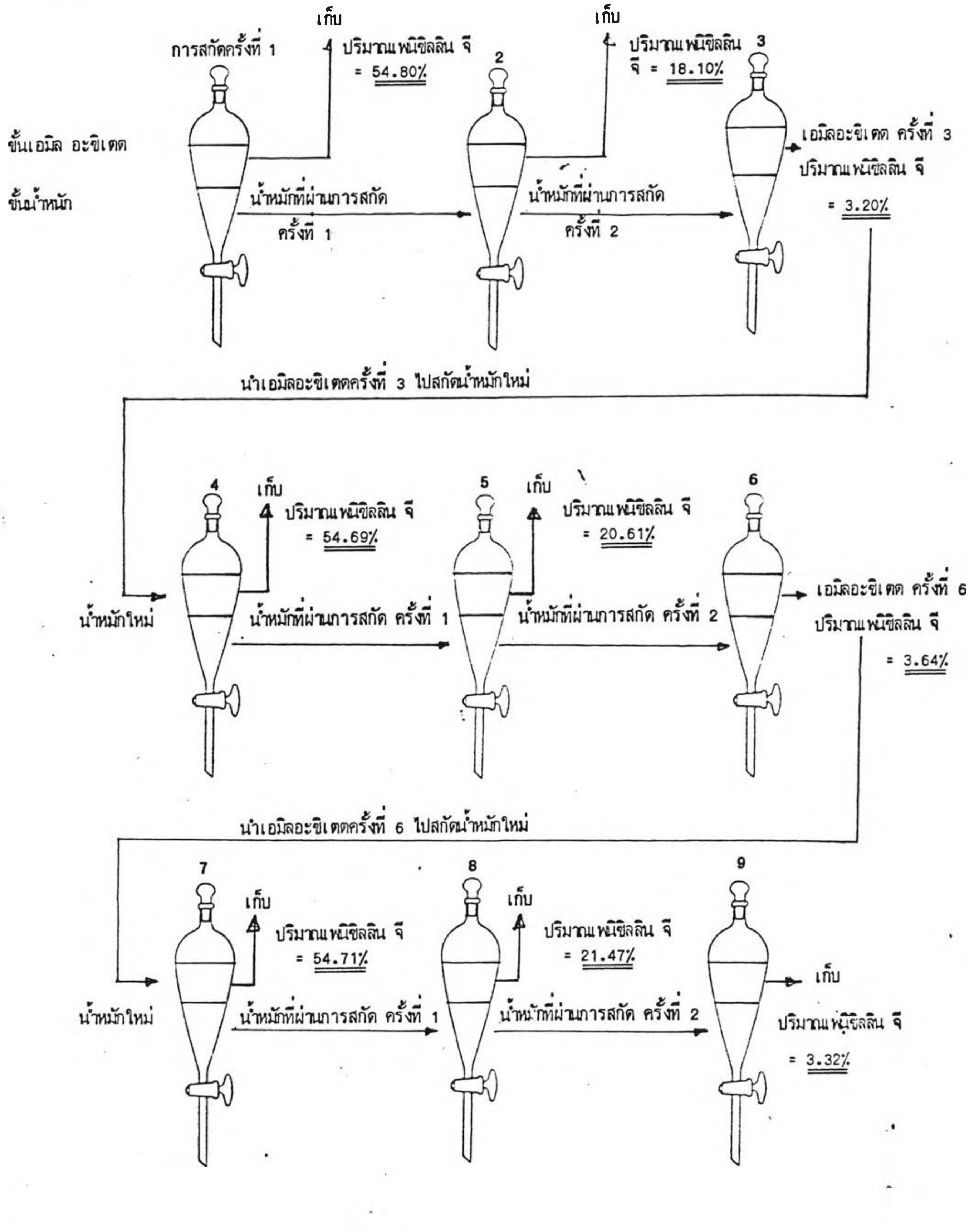
** ตรวจไม่พบเพนนิซิลลิน จี

3.1.6 การลดปริมาณเอมิลอะซิเตตที่ใช้ในการสกัด

จากการทดลองที่ 3.1.4 ในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักโดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำหมัก : เอมิลอะซิเตต 1:1 เวลา 30 นาที ในการสกัดแยกครั้งที่ 3 พบว่า มีปริมาณเพนิซิลลิน จี ในเอมิลอะซิเตตเพียง 3.16% (ดังแสดงในตารางที่ 3) ดังนั้น จึงนำเอาเอมิลอะซิเตตที่ผ่านการสกัดครั้งที่ 3 มาสกัดกับน้ำหมักใหม่ซ้ำ (รูปที่ 9) เพื่อเป็นการประหยัดปริมาณเอมิลอะซิเตต ประหยัดเวลาและพลังงาน ในการทำให้เพนิซิลลิน จี เข้มข้น การสกัดด้วยวิธีดังกล่าวจะได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี เฉลี่ย 75.90%

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 การสกัดแยกโดยนำเอมิลอะซิเตดผ่านการสกัดครั้งที่ 3 มาสกัดน้ำหมักใหม่



3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่านก่อนตกผลึก

3.2.1 อุณหภูมิและปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อน

สกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตตตามวิธีข้อ 2.4.1 โดยปรับค่า pH ของน้ำหมักเป็น 3.0 เติมซีติลไตรเมตทิวแอมโมเนียมโบรไมด์ 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราส่วนน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต 1:1 สกัดเป็นเวลา 30 นาที สกัด 3 ครั้งแล้วรวมเพนิซิลลิน จี ซึ่งอยู่ในชั้นเอมิลอะซิเตตเข้าด้วยกัน นำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนและสีด้วยผงถ่าน ในการขจัดสิ่งปนเปื้อนและสีด้วยผงถ่านได้ดีขึ้นอยู่กับปัจจัย 3 ชนิด คือ อุณหภูมิที่ใช้ ระยะเวลาของการดูดซับด้วยผงถ่าน และปริมาณของผงถ่านที่ใช้ ตามปกติที่อุณหภูมิสูง การขจัดสิ่งปนเปื้อนและสีจะทำได้ดี แต่เพนิซิลลิน จี เป็นสารที่ถูกทำลายที่อุณหภูมิสูง ดังนั้น ในการทดลองนี้จะแปรผันอุณหภูมิที่ 20° , 25° , 30° และ 35° ซ. และ ปริมาณผงถ่านที่ 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) [จากรายงาน Sylvester และ Coghill (7,9) ปริมาณผงถ่านที่ใช้ 0.25-0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร)] ใช้ระยะเวลาการดูดซับ 30 นาที ทำการวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีข้อ 2.3 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25° และ 30° ซ. หลังการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยถ่าน จะมีปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ในเอมิลอะซิเตตใกล้เคียงกัน เมื่อใช้ปริมาณผงถ่านเท่ากัน (ตารางที่ 5) ซึ่งผลการทดสอบทางสถิติไม่มีความแตกต่างกัน (ภาคผนวกที่ 4) แต่ที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. น่าจะเหมาะสมมากกว่า เพราะที่อุณหภูมิ 30° ซ. เป็นอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องสะดวกในการทดลอง ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจะเลือกอุณหภูมิที่ 30 ° ซ. ปริมาณผงถ่าน 0.1%-0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการขจัดสิ่งปนเปื้อน

ตารางที่ 5 ผลการหาอุณหภูมิและปริมาณที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน

ปริมาณผงถ่าน (กรัม/100มล.)	อุณหภูมิ (° ซ.)	ปริมาณเพนิซิลลิน จี (%) 20	25	30	35
0.1		76.14 (สีเหลือง)	73.86 (สีเหลือง)	73.18 (สีเหลือง)	63.62 (สีเหลือง)
0.2		76.02 (สีเหลือง)	72.12	72.60	59.24
0.3		75.80 (สีเหลือง)	70.64	71.25	54.94
0.4		75.72 (สีเหลือง)	67.87	68.54	50.27
0.5		74.34 (สีเหลือง)	61.68	61.10	44.76

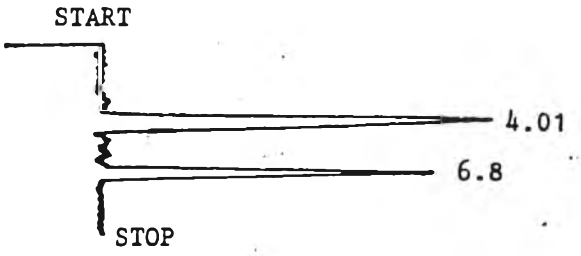
หมายเหตุ * ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ในเอมิลอะซิเตตเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักเท่ากับ 100%

จากตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 35° ซ. ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ในเอมิลอะซิเตตหลังจากขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่านต่ำกว่าที่อุณหภูมิอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยความร้อน จึงได้ลองนำเพนิซิลลิน จี มาตรฐาน มาละลายน้ำ นำไปควบคุมที่อุณหภูมิที่ 30 ° ซ. และ 35 ° ซ. เป็นเวลา 30 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี พบว่า ที่ 30 ° ซ. เพนิซิลลิน จี สูญหายไปเพียงเล็กน้อย ประมาณ 1% เมื่อเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี มาตรฐานเริ่มต้น (รูปที่ 10,11) ที่อุณหภูมิ 35 ° ซ. เพนิซิลลิน จี สูญหายไปประมาณ 12% เมื่อเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี มาตรฐานเริ่มต้น ที่กำหนดให้เป็น 100% (รูปที่ 12,13) ที่อุณหภูมิสูง เพนิซิลลิน จี สลายให้สารอื่นเกิดขึ้นโดยปรากฏที่ t_R ประมาณ 2.08 ถึง 2.12

รูปที่ 10 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ **วิเคราะห์โดย** HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 4.01 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 6.80 นาที

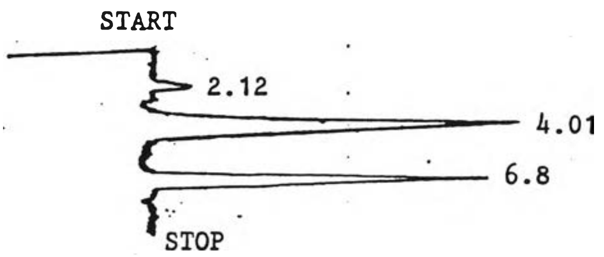


#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		4.01	54.1162		35707
0		6.8	45.8837		30275
		TOTAL	99.9999		65982

รูปที่ 11 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ. เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ **วิเคราะห์โดย** HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 4.01 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 6.80 นาที



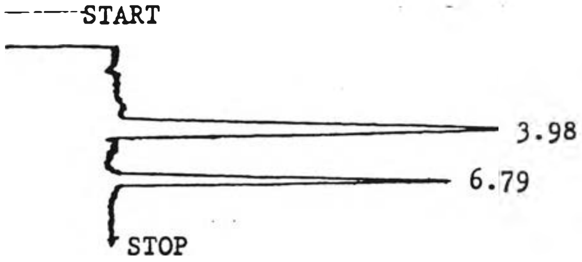
#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		2.12	0.9059		597
0		4.01	53.2928		35120
0		6.8	45.8012		30183
		TOTAL	99.9999		65900

I18100922

รูปที่ 12 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ วิเคราะห์โดย HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 3.98 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 6.79 นาที

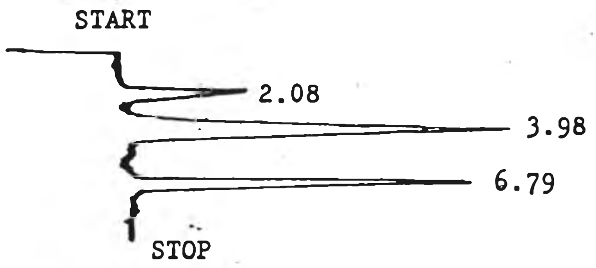


#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		3.98	55.3236		37370
0		6.79	44.6763		30178
		TOTAL	99.9999		67548

รูปที่ 13 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35° ซ. เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ **วิเคราะห์โดย** HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 3.98 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 6.79 นาที



#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		2.08	6.2130		4174
0		3.98	48.7072		32722
0		6.79	45.0797		30285
		TOTAL	99.9999		67181

3.2.2 เวลาที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน

นำสารละลายเพนิซิลลิน จี ซึ่งอยู่ในเอมิลอะซิเตต ตามวิธีข้อ 2.4.1 มาเติมผงถ่าน โดยแปรผันปริมาณผงถ่านที่ใช้ 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) นำมากวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก ตามวิธีข้อ 2.4.2 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 ° ซ. แปรผันเวลาที่ใช้ในการขจัดสิ่งปนเปื้อน 10 , 20 และ 30 นาที ในการทดลองนี้จะอาศัยการดูสีของชั้นเอมิลอะซิเตตหลังจากการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน ถ้ามีสีเหลืองเหลืออยู่แสดงว่า ผงถ่านดูดซับสิ่งเจือปนได้น้อย ผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 30 นาที และใช้ผงถ่านปริมาณ 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) เอมิลอะซิเตตที่ผ่านผงถ่านจะใสไม่มีสี (ตามรูปที่ 14)

ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้ช่วงเวลาสำหรับการดูดซับด้วยผงถ่านเป็นเวลา 30 นาที และแปรผันปริมาณผงถ่านที่ใช้ 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตกผลึกเพนิซิลลิน จี ในสารละลายที่ผ่านการดูดซับด้วยผงถ่านปริมาณต่างๆ กัน

<u>รูปที่14</u> เอมิลอะซิเตตที่ผ่านการสกัดก่อนเติมผงถ่าน และหลังเติมผงถ่านที่เวลา 30 นาที และใช้ปริมาณผงถ่าน 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

3.2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณผงถ่านที่ใช้ และประสิทธิภาพของการตกผลึก

เพนิซิลลิน จี ที่อยู่ในชั้นเอมิลอะซิเตตผ่านวิธีที่ 2.4.1 นำมาเติมผงถ่านควบคุมอุณหภูมิ 30 ° ซ. โดยแปรผันปริมาณผงถ่านที่ใช้ 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ทำการกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 30 นาที กรองผงถ่านออก นำชั้นเอมิลอะซิเตตมาเติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ตามวิธีข้อ 2.4.3 ผลการทดลอง (ตารางที่ 6) พบว่า ปริมาณผงถ่าน 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) จะได้ผลึกเพนิซิลลิน จี 44.78% ค่าเฉลี่ยสูงกว่าเมื่อใช้ผงถ่านปริมาณ 0.2 , 0.3 และ 0.4% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ซึ่งผลการทดสอบทางสถิติมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวกที่ 5) ถึงแม้ว่าปริมาณผงถ่าน 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) จะมีปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ที่ผงถ่านประมาณ 60.80% ซึ่งจะน้อยกว่าปริมาณผงถ่านที่ 0.2 , 0.3 และ 0.4% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ซึ่งจะมีปริมาณเพนิซิลลิน จี ประมาณ 72.98% , 71.00% และ 67.92% เนื่องจากปริมาณผงถ่านที่มากขึ้นจะดูดซับเพนิซิลลิน จี และสิ่งปนเปื้อนได้มากขึ้น เมื่อสิ่งเจือปนถูกขจัดได้มาก เพนิซิลลิน จี ในรูปเกลือโซเดียมก่อนที่จะตกผลึกค่อนข้างบริสุทธิ์ การตกผลึกจึงได้มากกว่าเมื่อใช้ปริมาณผงถ่าน 0.2 , 0.3 และ 0.4% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้ปริมาณผงถ่าน 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ในการขจัดสิ่งปนเปื้อน

ตารางที่ 6 การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณผงถ่านที่ใช้ และประสิทธิภาพของการตกผลึก

เปอร์เซนต์ผงถ่าน (กรัม/100มล.)	ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่เมื่อผ่านผงถ่าน (%)*	ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่อยู่ในรูปเกลือโซเดียม (%)*	ผลึกเพนิซิลลิน จี (%)*
0.2	72.98	69.87	31.70
0.3	71.00	68.02	39.05
0.4	67.92	64.99	42.64
0.5	60.80	57.90	44.78

หมายเหตุ * เปอร์เซนต์ของเพนิซิลลิน จี ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมัก ซึ่งตั้งไว้ 100%

3.2.4 ชะล้างผงถ่านด้วย 80% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของอะซิโตน

การขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่านจะสูญเสียปริมาณเพนิซิลลิน จี ไปประมาณ 14.7% (โดยเปรียบเทียบปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักที่ตั้งไว้ 100%) เนื่องจากผงถ่านนอกจากจะดูดซับสิ่งปนเปื้อนและสีแล้ว ยังสามารถดูดซับเพนิซิลลิน จี ได้ด้วย ถ้าลดปริมาณผงถ่านลง ประสิทธิภาพในการขจัดสิ่งปนเปื้อนและสีก็ลดลงด้วย ทำให้การตกผลึกเกิดได้ยากขึ้น เมื่อไม่สามารถลดปริมาณผงถ่าน จึงจำเป็นต้องหาสารมาชะล้างเพนิซิลลิน จี ที่ติดอยู่กับผงถ่านออกมา โดยใช้เอมิลอะซิเตตชะล้าง ปรากฏว่าไม่สามารถชะเพนิซิลลิน จี ออกมาได้ จากรายงานของ Whitmore และคณะ (6) ได้ใช้ 80% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อะซิโตน ชะล้างเพนิซิลลิน จี ออกจากผงถ่าน ดังนั้น ในการทดลองจึงได้ลองชะผงถ่านที่ดูดซับเพนิซิลลิน จี ด้วย 80% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อะซิโตน เมื่อนำอะซิโตนที่ชะผงถ่านไปวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีข้อ 2.3 พบว่า ได้เพนิซิลลิน จี กลับมาอีก 7.28%

3.3 การหาชนิดและปริมาณของเกลือโซเดียมที่เหมาะสมในการตกผลึก

3.3.1 สารประกอบโซเดียมที่เหมาะสมในการตกผลึก

นำสารละลายเพนิซิลลิน จี ในเอมิลอะซิเตตที่ผ่านการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน 0.5% (กรัมต่อ 100มิลลิลิตร) มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน ให้ปริมาณเพนิซิลลิน จี ในเอมิลอะซิเตตเข้มข้นขึ้นประมาณ 0.3 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามวิธีข้อ 2.4.3 ทดลองใช้สารที่ทำให้เพนิซิลลิน จี อยู่ในรูปเกลือโซเดียม 3 ชนิด ดังนี้

1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์

2 โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์

3 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์

พบว่า โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเหมาะสมในการทำให้เพนิซิลลิน จี อยู่ในรูปของเกลือโซเดียม ปริมาณผลึกเพนิซิลลิน เฉลี่ยเท่ากับ 44.61% (ตารางที่ 7) ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็นสารที่เติมให้เพนิซิลลิน จี อยู่ในรูปเกลือโซเดียม

ตารางที่ 7 ปริมาณเกลือโซเดียมของเพนิซิลลิน จี ที่ตกผลึกเมื่อใช้สารประกอบโซเดียมต่างกัน 3 ชนิด

ชนิดของสารประกอบโซเดียม	ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายโซเดียม	ปริมาตรของสารละลายโซเดียม (ml)	ปริมาณเพนิซิลลิน จี (%)*
โซเดียมไฮดรอกไซด์	13.30	125	29.06
โซเดียมอะซิเตต	8.66	133	33.41
โซเดียมไฮโดรเจน-คาร์บอเนต	7.97	145	44.61

หมายเหตุ * เปอร์เซนต์ของเพนิซิลลิน จี โดยเปรียบเทียบปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหนักที่ตั้งไว้ 100%

รูปที่ 15 สรุปขั้นตอนการสกัดและแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมัก

น้ำหมัก ให้ปริมาตรเพนิซิลลิน จี 100%

น้ำหมักที่ผ่านการสกัดครั้งที่ 1
ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ 40.80% (หายไป = 4.22%)

น้ำหมักที่ผ่านการสกัดครั้งที่ 2
ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ 12.45% (หายไป = 9.78%)

น้ำหมักที่ผ่านการสกัดครั้งที่ 3
ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ 0% (หายไป = 9.16%)

เอมิลอะซิเตตที่สกัดได้ครั้งที่ 1
ปริมาณเพนิซิลลิน จี 54.98%

เอมิลอะซิเตตที่สกัดได้ครั้งที่ 2
ปริมาณเพนิซิลลิน จี 18.57%

เอมิลอะซิเตตที่สกัดได้ครั้งที่ 3
ปริมาณเพนิซิลลิน จี 3.29%

เอมิลอะซิเตตจากการสกัด 3 ครั้งนำมารวมกัน
ปริมาณเพนิซิลลิน จี 76.84%

ผ่านผงถ่าน
ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ 61.66%

หายไป 15.18% **หมายเหตุ** เพนิซิลลิน จี ที่ติดอยู่กับผงถ่านจะออกด้วย 80% (ปริมาตรต่อปริมาตร)อะซิโตน
ปริมาณเพนิซิลลิน จี 7.14%

ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ผ่านผงถ่าน + ส่วนที่จะออกด้วย 80% (ปริมาตร/ปริมาตร) อะซิโตน 68.72%

เติม 1.2 M ของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต
(ปริมาตร 104.2 มิลลิลิตร)

ชั้นเอมิลอะซิเตต(ลักษณะของสาร-ละลายเหนียวไม่ละลายในตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี)

ชั้นน้ำ
ปริมาณเพนิซิลลิน จี 65.59%

น้ำล้างผลึก
ปริมาณเพนิซิลลิน จี 11.38%

ผลึก
เพนิซิลลิน จี โซเดียม
ปริมาณเพนิซิลลิน จี 52.61%

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่สกัดแยกออกจากน้ำหมักในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอนในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จีออกจากน้ำหมัก	ปริมาณเพนิซิลลิน จี (%)*
น้ำหมัก	100.00
เอมิลอะซิเตตที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 1	54.98
เอมิลอะซิเตตที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 2	18.57
เอมิลอะซิเตตที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 3	3.29
เอมิลอะซิเตตจากการสกัด 3 ครั้ง มารวมกัน	76.84
เอมิลอะซิเตตหลังจากผ่านผงถ่าน	61.66
ส่วนที่ชะออกมาจากผงถ่านด้วย 30% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อะซิโตน	7.14
เพนิซิลลิน จี ในชั้นน้ำที่ได้จากการเติมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	65.59
ผลึกเพนิซิลลิน จี โซเดียม	52.61

หมายเหตุ * เปอร์เซนต์ของเพนิซิลลิน จี โดยเปรียบเทียบปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักที่ตั้งไว้ 100%

จากรูปที่ 15 ปริมาณเพนิซิลลิน จี จะสูญเสียมากที่สุดในขั้นตอนของการสกัดซึ่งสูญเสียเพนิซิลลิน จี ไปประมาณ 23% การสูญเสียไปในปริมาณสูงเป็นเพราะในขั้นตอนการสกัดจำเป็นต้องปรับ pH ของน้ำหมักเป็น 3.0 ด้วยกรดฟอสฟอริคเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) และจากรายงานของ Sylvester (9) กรดจะทำลายโครงสร้างของเพนิซิลลิน จี เพื่อพิสูจน์สาเหตุของการสูญเสีย จึงได้ทำการทดลองโดยนำเพนิซิลลิน จี มาตรฐาน มาละลายน้ำ แล้วปรับ pH เป็น 3.0 ด้วยกรดฟอสฟอริคความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °ซ. (อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด) วิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ เวลา 1 , 2 , 3 , 4 และ 5 ชั่วโมง หลังจากปรับ pH ตามรูปที่ 16 พบว่า เพนิซิลลิน จี ได้เปลี่ยนสภาพไปเป็นสารที่มี t_R ประมาณ 2.39-2.4 สารใหม่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะ

เวลา ขณะที่ปริมาณเพนิซิลลิน จี ลดลง และจากตารางที่ 10 ปริมาณเพนิซิลลิน จี สูญเสียเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ประมาณ 14.92% ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่สูญเสียไปในระหว่างการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 15 จากข้อมูลที่ได้แสดงว่า เพนิซิลลิน จี สูญหายไปในระหว่างการสกัดนั้น เกิดขึ้นเพราะถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค

<u>ตารางที่ 9</u> ปริมาณเพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค ความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเพนิซิลลิน จี (%)*	
	ที่เหลืออยู่	สูญหาย
1	85.08	14.92
2	59.54	40.46
3	31.67	68.33
4	13.47	86.26
5	0.00	100.00

หมายเหตุ * คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี เริ่มต้น = 100%

รูปที่ 16 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค ความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ **วิเคราะห์โดย** HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 4.04-4.05 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 6.80-6.82 นาที

16.1 เพนิซิลลิน จี เริ่มต้นก่อนถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค

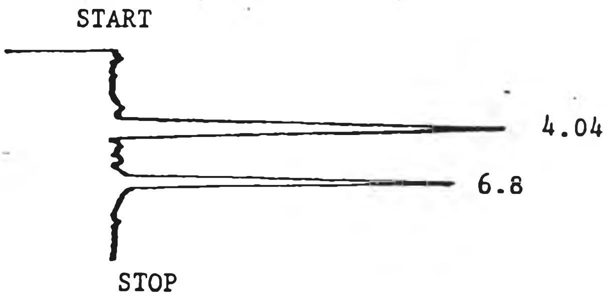
16.2 เพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง

16.3 เพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง

16.4 เพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง

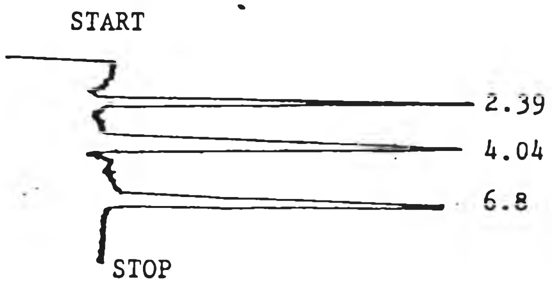
16.5 เพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง

16.6 เพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง



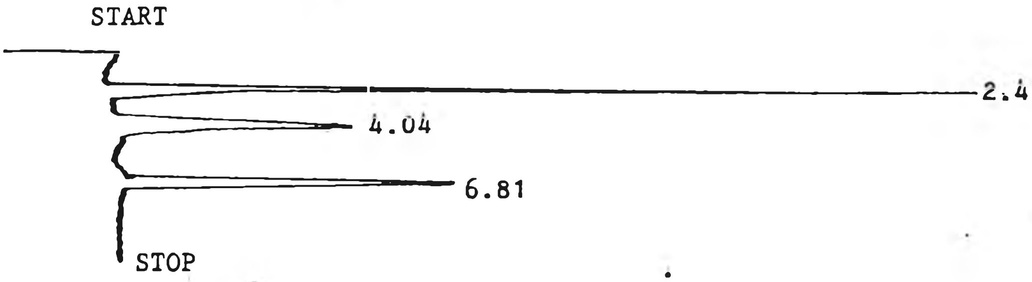
#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		4.04	54.0861		35626
0		6.8	45.9138		30243
		TOTAL	99.9999		65869

รูปที่ 16.1



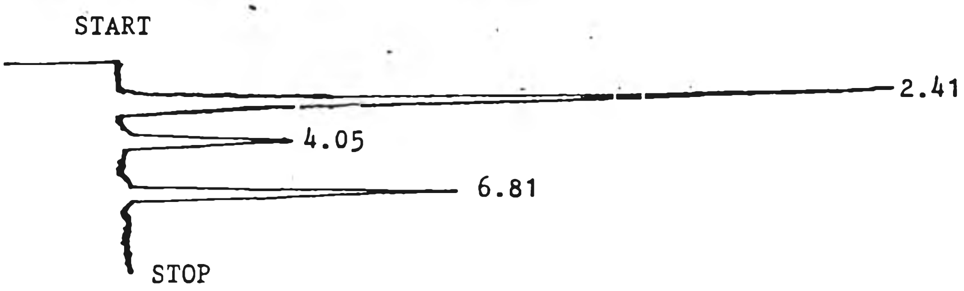
#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		2.39	17.7364		13247
0		4.04	41.5368		31023
0		6.8	40.7267		30418
		TOTAL	99.9999		74688

รูปที่ 16.2



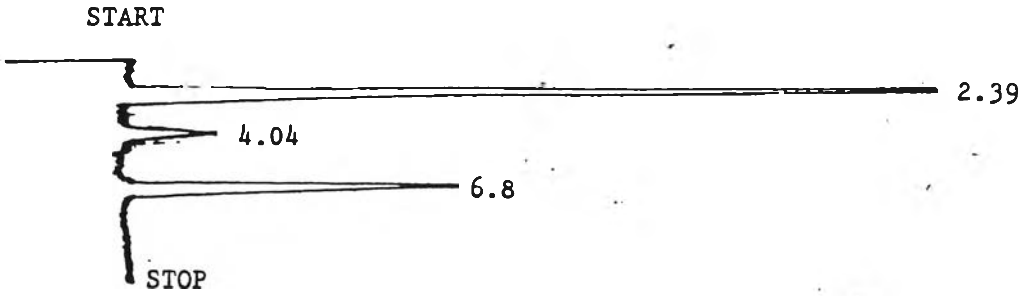
#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		2.4	40.4624		34565
0		4.04	23.9965		20499
0		6.81	35.5410		30361
		TOTAL	99.9999		85425

รูปที่ 16.3



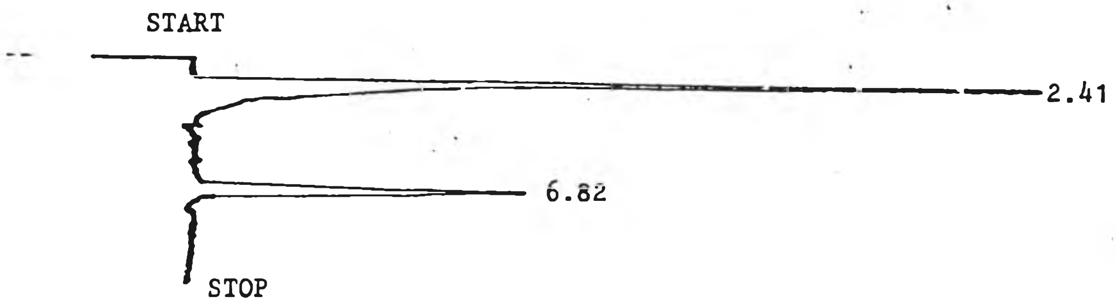
#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		2.41	56.1810		53086
0		4.05	11.9387		11281
0		6.81	31.8802		30124
		TOTAL	99.9999		94491

รูปที่ 16.4



#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		2.39	65.1366		65889
0		4.04	4.8401		4896
0		6.8	30.0232		30370
		TOTAL	99.9999		101155

รูปที่ 16.5



#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		2.41	71.1089		75453
0		6.82	28.8910		30656
			99.9999		106109

รูปที่ 16.6

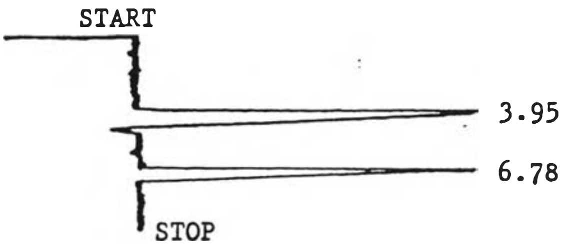
3.3.3 หาเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของเพนิซิลลิน จี

นำผลึกเพนิซิลลิน จี มาตรฐาน และผลึกเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการทดลอง อบในตู้อบระบบสูญญากาศ (vacuum oven) ที่อุณหภูมิ 40 ° ซ. เวลา 3 ชั่วโมง นำมาทำให้เย็นในโถแก้วเก็บสารในระบบสูญญากาศ (vacuum desicator) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากรูปที่ 17-18 พบว่า ผลึกเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการทดลองมีความบริสุทธิ์ประมาณ 96%

รูปที่ 17 ลักษณะโครมาโตแกรมเพนิซิลลิน จี มาตรฐาน โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ วิเคราะห์โดย HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 3.95 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 6.78 นาที

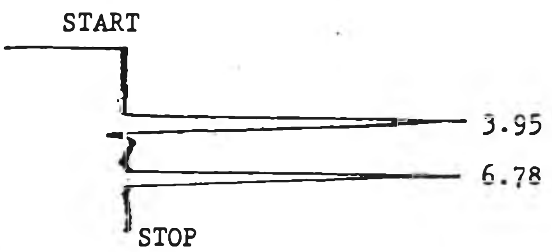


#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		3.95	51.8803		32599
0		6.78	48.1196		30236
	TOTAL		99.9999		62835

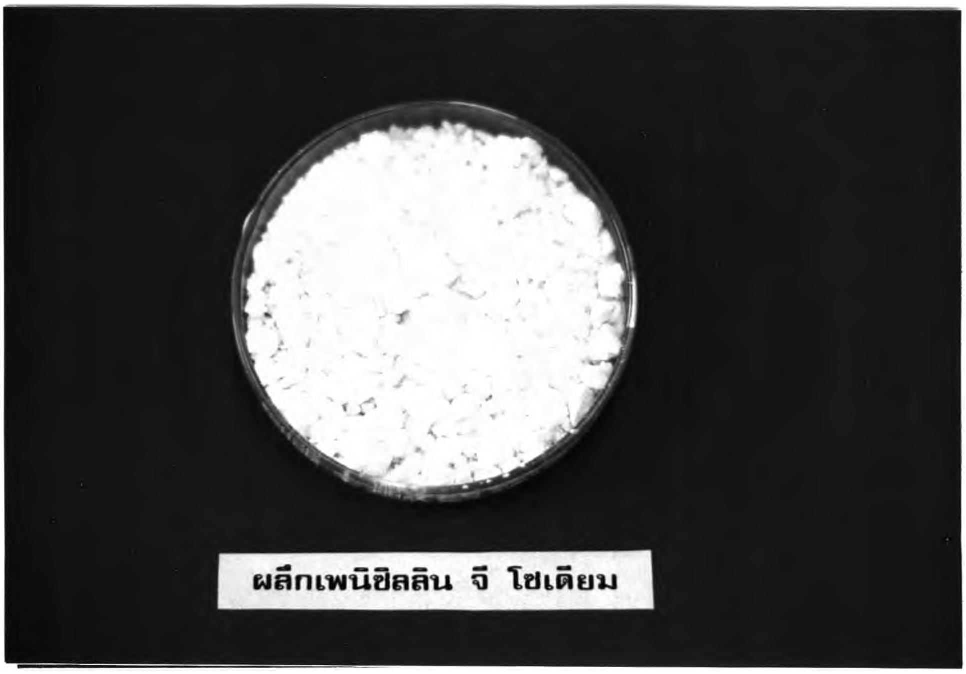
รูปที่ 18 ลักษณะโครมาโตแกรมเพนิซิลลิน จี (ผลิกที่ได้จากการทดลอง) โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็น สารมาตรฐานเปรียบเทียบ **วิเคราะห์โดย HPLC**

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 3.95 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 6.78 นาที



#	NAME	TIME	CONC.	MK	AREA
0		3.95	50.9937		31328
0		6.78	49.0062		30107
		TOTAL	99.9999		61435



รูปที่ 19 ผลึกเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการทดลอง