บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุป

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 เนื่องจากในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักในระดับอุตสาหกรรมไม่มีรายงานอย่างละเอียดของขั้นตอนต่างๆ ตลอดจนสภาวะที่ใช้ในกระบวนการผลิต เพราะเป็นความลับทางอุตสาหกรรม จึงมีความจำเป็นที่จะศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแยกและทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์ทุกขั้นตอนอย่างละเอียดพอที่จะนำไปปฏิบัติได้ เพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตต การแยกชั้นระหว่างน้ำหมักและเอมิลอะซิเตตไม่ค่อยสมบูรณ์ จะเกิดการรวมตัวกันระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตบางส่วน. (รูปที่ 7) เนื่องจากในน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 จะมีสารอินทรีย์หลายชนิดปะปนอยู่ในน้ำหมัก รวมทั้งโปรตีนชนิดต่างๆ อยู่ด้วย จึงทำให้การแยกชั้นน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตไม่ดีเท่าที่ควร จากรายงานของ Loven และคณะ (12) ใช้ 1% (น้ำหมักต่อปริมาตร) กรดแทนนิกตกตะกอนโปรตีนจะเกิดการสูญเสียเพนิซิลลิน จี ไปถึง 60% จากปริมาณเพนิซิลลินจี ในน้ำหมักเริ่มต้น 100% เนื่องจาก pH ของ 1% (น้ำหมักต่อปริมาตร) กรดแทนนิกมีค่าประมาณ 2.3 Sylvester และคณะ (9) ได้รายงานไว้ว่า เพนิซิลลิน จี ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด จะเกิดการสลายในส่วนของนิวเคลียสที่เป็นวงแหวนเบตาแลคแตมจะได้สารตัวใหม่เรียกว่า กรดเพนิลิก ดังนั้น ส่วนของเพนิซิลลิน จี ที่หายไปเมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดแทนนิกน่าจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดเพนิลิก จากการใช้สารเคมีอีก 3 ชนิดตกตะกอนโปรตีน พบว่า การใช้ 80% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอนโปรตีนจะถูกทำลายไปประมาณ 28.8% จากปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักเริ่มต้น 100% เนื่องจาก pH ของ 80% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าประมาณ 5.1 Sylvester และคณะ (9) ได้รายงานไว้ว่า เพนิซิลลิน จี ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด จะเกิดการสลายในส่วนของนิวเคลียสที่เป็นวงแหวนเบตาแลคแตมจะได้สารตัวใหม่เรียกว่า กรด

เพนิลิก ดังนั้นส่วนของเพนิซิลลิน จี ที่หายไปเมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วย 95% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตน่าจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดเพนิลิก เมื่อใช้อะซิโตนตกตะกอนโปรตีน ปริมาณเพนิซิลลิน จี จะถูกทำลายไปประมาณ 34.6% จากปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมัก 100% Florey และคณะ (21) ได้รายงานไว้ว่าอะซิโตนเป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ทำลายโครงสร้างของเพนิซิลลิน จี อาจจะเนื่องมาจากออกซิเจนในอะซิโตนมีประจุลบสูง จะเข้าทำปฏิกิริยาบริเวณวงแหวนเบตาแลคแตมทำให้พันธะในวงแหวนเปิดออก ซึ่งโครงสร้างภายหลังจากอะซิโตนเข้าทำปฏิกิริยาไม่มีรายงานรายละเอียดไว้ ดังนั้น ส่วนเพนิซิลลิน จี ที่หายไปเมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนน่าจะถูกเปลี่ยนเป็นสารชนิดอื่น เมื่อใช้ 95% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เอรานอลตกตะกอนโปรตีน ปริมาณเพนิซิลลิน จี จะถูกทำลายไป 35.9% จากปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักเริ่มต้น 100% Sylvester และคณะ (9) ได้รายงานไว้ว่าเอรานอลทำลายวงแหวนเบตาแลคแตมของเพนิซิลลิน จี โดยเปลี่ยนเพนิซิลลิน จี เป็นกรดเอลฟาเอธิลเพนิซิโลอิก ดังนั้น ส่วนของเพนิซิลลิน จี ที่หายไปเมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วย 95% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เอรานอลน่าจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดเอลฟาเอธิลเพนิซิโลอิก จะเห็นได้ว่าการตกตะกอนโปรตีนในน้ำหมักก่อนการสกัดจึงไม่ใช่วิธีแก้ที่เหมาะสม

จากรายงานของ Sylvester และคณะ (9) ได้มีการใช้ซิติวไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ เป็นสารช่วยลดการรวมตัวระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต จากการทดลองที่ 3.2.1 พบว่า ปริมาณซิติวไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถช่วยให้การแยกชั้นระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตแยกจากกันได้ดี

ค่า pH ของน้ำหมักก่อนการสกัดมีบทบาทที่สำคัญต่อปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ถูกสกัดมาอยู่ในชั้นของเอมิลอะซิเตต ทั้งนี้เนื่องจากเพนิซิลลิน จี ที่อยู่ในน้ำหมักที่มีสภาวะที่เป็นกลาง เพนิซิลลิน จี ที่อยู่ในรูปเกลือหรืออิออนจะละลายได้ดีในน้ำ ซึ่งสภาวะที่เป็นกลางนี้เป็นสภาวะปกติที่ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ เพนิซิลลิน จี เมื่อละลายอยู่ในน้ำหมักค่า pH ประมาณ 6.8 จะอยู่ในรูปเกลือหรืออิออน ในการสกัดเพนิซิลลิน จี ให้มาอยู่ในเอมิลอะซิเตตจำเป็นต้องปรับค่า pH ในน้ำหมักให้อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ในสภาวะที่เป็นกรดนี้เพนิซิลลิน จี จะอยู่ในรูปกรดอิสระซึ่งละลายในน้ำหมักได้น้อยแต่ละลายในเอมิลอะซิเตตได้ดี ในช่วง pH ต่ำๆ (2.0-3.0) จะทำให้เพนิซิลลิน จี เป็นกรดอิสระมากกว่าในช่วง pH 3.5-4.0 เพนิซิลลิน จี ที่อยู่ในน้ำหมักที่เป็นกรดจะ

ถูกสลายด้วยกรดอย่างรวดเร็วทำให้เกิดการสูญเสีย จึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิของการสกัดให้อยู่ในช่วงที่ค่อนข้างต่ำ ประมาณ 4-6 °ซ. ซึ่งจะช่วยในการสลายของเพนิซิลลิน จี ช้าลง ในการสกัดจะต้องหาค่า pH ที่เหมาะสม ถ้าเป็นกรดต่ำมากจะสกัดได้ดี แต่ขณะเดียวกันก็จะสูญเสียเพนิซิลลิน จี มากเนื่องจากการสลายตัวของเพนิซิลลิน จี จากการทดลองพบว่า ค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 3.0

ในการสกัดเพนิซิลลิน จี เวลาเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญอีกอันหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากในการสกัดแต่ละครั้งถ้าใช้เวลาน้อยเกินไป การสัมผัสระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตน้อย ถ้าใช้เวลาในการสกัดมากเกินไป เพนิซิลลิน จี ก็จะถูกทำลายในสภาวะที่เป็นกรด จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงเวลาที่พอเหมาะในการสกัด จากการทดลองข้อ 3.1.4 และ 3.1.5 พบว่า เวลาที่เหมาะสมในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตต 30 นาที

อัตราส่วนในการสกัดระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญเพราะว่า ปริมาณเอมิลอะซิเตตที่ใช้ถ้าน้อยเกินไป การแยกชั้นระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตก็จะไม่ดีเท่าที่ควร ถึงแม้ว่าจะเติมสารช่วยลดการรวมตัวระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต เพราะหลักในการสกัดสารด้วยสารละลายอินทรีย์ใช้ปริมาณที่น้อยแต่สกัดหลายๆ ครั้ง จะดีกว่าการสกัดด้วยสารอินทรีย์ปริมาณที่มากเพียงครั้งเดียว ในการศึกษานี้ได้ใช้อัตราส่วนน้ำหมักต่อเอมิลอะซิเตต 1:1 และ 1:2 โดยให้มีความสัมพันธ์กับเวลาและค่า pH จากการทดลองข้อ 3.1.5 พบว่า ในอัตราส่วนน้ำหมักต่อเอมิลอะซิเตต 1:1 จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ค่า pH 3.0 จะทำให้เพนิซิลลิน จี ละลายเข้ามาอยู่ในเอมิลอะซิเตตได้สูงประมาณ 72.33% เมื่อเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักเริ่มต้นคิดเป็น 100%

การทดลองข้อ 3.1.4 ในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักโดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักต่อเอมิลอะซิเตต 1:1 เวลา 30 นาที ในการสกัดแยกครั้งที่ 3 พบว่า มีปริมาณเพนิซิลลิน จี ในเอมิลอะซิเตตเพียง 3.16% ดังนั้น ในการทดลองข้อ 3.1.6 จึงนำเอาเอมิลอะซิเตตที่ผ่านการสกัดครั้งที่ 3 มาสกัดกับน้ำหมักใหม่ซ้ำ เพื่อเป็นการประหยัดปริมาณเอมิลอะซิเตต ประหยัดเวลา และ พลังงานในการทำให้เพนิซิลลิน จี เข้มข้น ในการสกัดด้วยวิธีนี้จะได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี เฉลี่ยประมาณ 75.9% เทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักเริ่มต้นคิดเป็น 100%

ในการขจัดสิ่งปนเปื้อนและสีด้วยผงถ่าน ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง คือ อุณหภูมิ เวลา และปริมาณผงถ่านที่ใช้ ผงถ่านจะมีประสิทธิภาพในการขจัดสิ่งปนเปื้อนและสีได้ดีที่อุณหภูมิสูง ในการทดลองนี้ไม่สามารถจะทำที่อุณหภูมิสูงมาก เนื่องจากอุณหภูมิสูงเพนิซิลลิน จี จะถูกทำลาย (9) ดังนั้น จึงแปรผันอุณหภูมิที่ 20° , 25° , 30° และ 35° ซ. และจากการทดลองข้อ 3.2.1. พบว่า ที่อุณหภูมิ 25° และ 30° ซ. จะมีปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่ใกล้เคียงกัน แต่ที่อุณหภูมิ 30° ซ. น่าจะเหมาะสมมากกว่า เพราะที่อุณหภูมิ 30° ซ. เป็นอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องสะดวกในการทดลอง

เวลา และปริมาณผงถ่านที่ใช้จะศึกษาควบคู่กันไป ปริมาณผงถ่านมากจะทำให้การขจัดสิ่งปนเปื้อนได้ดี แต่ผงถ่านจะดูดซับเพนิซิลลิน จี เข้าไว้ด้วย แต่ถ้าปริมาณผงถ่านน้อย การขจัดสิ่งปนเปื้อนไม่ดีเท่าที่ควร จากรายงานของ Sylvester และ Coghill (7,9) ปริมาณผงถ่าน 0.25-0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อน จากการทดลองข้อ 3.2.2 โดยดูจากสีของเอมิลอะซิเตตเป็นหลัก พบว่า เติมผงถ่านเป็นเวลา 30 นาที และปริมาณผงถ่าน 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) จะไม่เห็นสีในชั้นเอมิลอะซิเตต แต่ยังไม่สามารถสรุปผลได้ ถึงปริมาณผงถ่านที่ดีที่สุดในการขจัดสิ่งปนเปื้อน เนื่องจากถ้าปริมาณผงถ่านน้อยเกินไป การขจัดสิ่งปนเปื้อนที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าอาจจะกระทำได้น้อยก็จะมีผลกระทบถึงการตกผลึกเพนิซิลลิน จี ในขั้นต่อไป เพราะการตกผลึกเพนิซิลลิน จี ได้บริสุทธิ์ และปริมาณที่มากจำเป็นต้องขจัดสิ่งปนเปื้อนให้ได้มากที่สุด และสูญเสียปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ถูกดูดซับด้วยผงถ่านน้อยที่สุด ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับการตกผลึกเพนิซิลลิน จี

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณผงถ่านที่ใช้และประสิทธิภาพของการตกผลึกโดยแปรผันปริมาณผงถ่านที่ใช้ 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 30° ซ. ระยะเวลาในการดูดซับ 30 นาที จากการทดลองข้อ 3.2.3 พบว่า ปริมาณผงถ่าน 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่จะทำให้เพนิซิลลิน จี ตกผลึกได้ปริมาณมากที่สุด ประมาณ 44.78% เมื่อเทียบกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักคิดเป็น 100% ถ้าสังเกตปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่เมื่อผ่านผงถ่าน พบว่า ปริมาณผงถ่าน 0.2% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ผ่านผงถ่านออกมา จะมีปริมาณมากกว่า 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ตามลำดับ แต่การที่ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ผ่านผงถ่านออก

มามากไม่ได้เป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะเลือกถึงปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมดังกล่าวแล้วข้างต้น เพราะปริมาณผงถ่านที่น้อยจะทำให้การตกผลึกเพนิซิลลิน จี ได้ในปริมาณที่น้อย ซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่งเจือปนที่หลงเหลืออยู่

จากการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ผ่านขั้นตอนนี้จะเหลือเพียง 61.2% สูญหายไปถึง 14.7% การสูญหายไปเกิดขึ้นเนื่องจากผงถ่านนอกจากจะดูดซับสิ่งปนเปื้อนและสีแล้วยังสามารถดูดซับเพนิซิลลิน จี ได้ด้วย จึงได้พยายามชะล้างเพนิซิลลิน จี ที่ติดอยู่ออกมาโดยใช้ 80% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของอะซีโตน (Whitmore และคณะ)(10) จากการทดลองข้อ 3.2.4. อะซีโตนชะล้างเพนิซิลลิน จี ออกมาได้เพียง 7.28%

ในการตกผลึกเพนิซิลลิน จี ให้อยู่ในรูปเกลือโซเดียม จากรายงานผลการวิจัยต่างๆ (1,7,12) ได้มีการใช้สารเคมี 3 ชนิด ที่จะทำให้เพนิซิลลิน จี อยู่ในรูปเกลือโซเดียม คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) จากการทดลองข้อ 2.3.1 พบว่า โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็นสารที่เหมาะสมในการทำให้เพนิซิลลิน จี อยู่ในรูปเกลือโซเดียมมากที่สุดประมาณ 44.6% เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 7.97 เมื่อเทียบกับสารละลายอีก 2 ชนิด ที่มีความเข้มข้นเดียวกัน จะมีค่าความเป็นด่างน้อยกว่า ดังนั้น การที่เพนิซิลลิน จี จะถูกทำลายในสภาวะที่เป็นด่างจึงน้อยกว่า ส่วนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ จะมีค่า pH 13.30 และ 8.66 ตามลำดับ สารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้มีความเป็นด่างค่อนข้างสูง Sylvester และคณะ (9) ได้รายงานไว้ว่า ในสภาวะความเป็นด่าง โครงสร้างของเพนิซิลลิน จี จะถูกทำลายเป็นกรดเพนิซิโลอิก จากการตกผลึกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ จะให้ปริมาณเพนิซิลลิน จี โซเดียม ที่ตกผลึกออกมาประมาณ 29.06% และ 33.41% ตามลำดับ ส่วนของเพนิซิลลิน จี ที่หายไปน่าจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดเพนิซิโลอิก

จากรูปที่ 15 จะแสดงให้เห็นถึงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่สกัดได้และการสูญเสียเพนิซิลลิน จี ไปในแต่ละขั้นตอนของการทำเพนิซิลลิน จี ให้บริสุทธิ์ ขั้นตอนที่ได้มีการสูญเสียเพนิซิลลิน จี มากที่สุด คือ ขั้นตอนของการสกัดที่มีการสูญเสียเพนิซิลลิน จี ประมาณ 23% ทั้งนี้เนื่องจากในการสกัดเพนิซิลลิน จี จำเป็นต้องปรับค่า pH 3.0 ซึ่งมีความเป็นกรดสูง เพนิซิลลิน จี จะถูกทำลายได้ง่าย จึงได้ทำการทดลองโดยนำเพนิ

ซิลลิน จี มาตรฐาน ละลายน้ำปรับค่า pH 3.0 ด้วยกรดฟอสฟอริค ความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 4° ซ. จากรูปที่ 16 และตารางที่ 11 พบว่า ปริมาณเพนิซิลลิน จี สูญเสียไปเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชม. ประมาณ 14.9% ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่สูญเสียไปในระหว่างการสกัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ซึ่งสูญเสียไปประมาณ 14% จากข้อมูลที่ได้ แสดงว่า เพนิซิลลิน จี สูญหายไปในระหว่างการสกัดนั้นเกิดขึ้นเพราะถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค ที่อุณหภูมิ 4° ซ. ก็ยับยั้งการสลายตัวอย่างรวดเร็วของเพนิซิลลิน จี ไม่ดีเท่าที่ควร ในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ได้ทำที่อุณหภูมิ 4°-6° ซ. ถึงแม้ว่า Queener และ Swartz (6) ได้รายงานไว้ว่า การสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ทำที่อุณหภูมิ 0-1° ซ. แต่การทดลองนี้ไม่สามารถที่จะกระทำได้ เนื่องจากขาดระบบควบคุมอุณหภูมิที่คุมได้ระดับ 0-1° ซ. ดังนั้น ถ้าสามารถหาเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดได้อย่างเหมาะสมก็จะลดการสูญเสียลงไปได้มาก จากรายงานของ Swartz และคณะ (1) ใช้เครื่องมิเคาน์เตอร์เคอร์เรนเป็นเครื่องมือที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้อย่างดี และการสัมผัสระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตค่อนข้างสมบูรณ์ จึงมีการสูญเสียเพนิซิลลิน จี ไปในขั้นตอนนี้เพียง 4-8%

การเปลี่ยนเพนิซิลลิน จี ในรูปของกรดอิสระที่ละลายได้ดีในเอมิลอะซิเตตให้อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมจะละลายได้ดีในน้ำ ขั้นตอนนี้จะเป็นการช่วยขจัดสิ่งปนเปื้อนที่ยังเหลืออยู่อีกขั้นตอนหนึ่ง เพราะสิ่งเจือปนที่ละลายได้ดีในเอมิลอะซิเตตจะไม่ละลายลงมาในน้ำ ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ผ่านผงถ่านและรวมส่วนที่ชะออกมาด้วย 90% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อะซิโตน ประมาณ 68.72% หลังจากเติมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ปริมาณเพนิซิลลิน จี โซเดียม ที่ละลายลงมาในชั้นน้ำประมาณ 65.59% สูญหายไป 3.13% เพนิซิลลิน จี สูญหายไปอาจจะเนื่องจากถูกสลายด้วยด่าง เพราะสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตมีฤทธิ์เป็นด่าง ถึงแม้ว่าจะทำโดยควบคุมอุณหภูมิที่เย็น และขณะที่เติมสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตได้ทำการกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้เกิดการสูญเสียจากการสลายตัวด้วยด่างน้อยที่สุด ได้ลองนำชั้นเอมิลอะซิเตตส่วนที่เหลือไปวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่อาจจะเหลืออยู่ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ จำเป็นจะต้องระเหยเอาเอมิลอะซิเตตออกไปเพื่อให้เพนิซิลลิน จี ที่เหลืออยู่เข้มข้นพอที่จะวิเคราะห์ได้ ลักษณะของสารละลายจะหนืดและเหนียวมากไม่สามารถละลายในสารละลายที่ใช้เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) ในการฉีด HPLC ผลการวิเคราะห์จึงไม่สามารถสรุปได้ว่ายังคงมีเพนิซิลลิน จี เหลืออยู่ในชั้นเอมิลอะซิเตต หรือถูกสลายด้วยด่าง

เพนิซิลลิน จี โซเดียม ที่ตกผลึกได้ประมาณ 52.61% ส่วนที่หายไปยังคงอยู่ในน้ำล้างผลึกประมาณ 12.38% ซึ่งส่วนนี้สามารถมาตกผลึกซ้ำได้อีก

จากการทดลอง 3.3.3. ความบริสุทธิ์ของผลึกเพนิซิลลิน จี โซเดียม ประมาณ 95%

จากรายงานวิจัยที่ได้เสนอนี้ ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่สกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้ออกมาเพียง 52.61% ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับระดับอุตสาหกรรมที่จะได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี ถึง 78.00% (1) ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ต่างกันอย่างมาก ในระดับอุตสาหกรรมได้ใช้เครื่องมือที่ทันสมัยและได้รับการพัฒนามาอย่างดี ทำให้เกิดการสูญเสียน้อย นอกจากนี้ปริมาณเพนิซิลลิน จี เริ่มต้นในน้ำหมักก็มีส่วนทำให้การสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ได้แตกต่างกัน ในระดับอุตสาหกรรมสามารถผลิตให้มีปริมาณเพนิซิลลิน จี สูงถึง 40-50 กรัมต่อลิตร (2,7) แต่ในการทดลองนี้ สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้เพียง 3.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากผลการวิจัยรายงานไว้ว่า การผลิตเพนิซิลลิน จี ในระดับอุตสาหกรรมผลิตได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี สูงเมื่อเทียบสัดส่วนกับสิ่งเจือปนจะน้อยกว่า ทำให้การสกัดแยกและการทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์ทำได้ง่ายกว่า (1)