บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาวิธีที่เหมาะสม ในการทำคานามัยซินซึ่งได้จากเชื้อ *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1 ให้บริสุทธิ์ จากการที่ ศรสดมภ์ ชัติยะวรา (2539) ซึ่งได้ปรับปรุง *Streptomyces kanamyceticus* K1 สายพันธุ์ตั้งต้นที่ผลิตคานามัยซินโดยวิธีการกลายพันธุ์ ได้สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ (2540) ได้ทำการศึกษาสายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น โดยการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะให้มีปริมาณสูงสุด เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น เนื่องจากสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยสายพันธุ์กลาย *S. kanamyceticus* UUNNK1 ยังมิได้มีการตรวจสอบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการทำสารปฏิชีวนะชนิดนี้ให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบโครงสร้างของสาร

ในการสกัดคานามัยซิน ออกจากน้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อปรับพีเอชของน้ำหมักให้ได้ 3.0 ด้วยกรดอะเซติค เข้มข้น 10 นอร์มัล จะทำให้ส่วนของเส้นใยตกตะกอนได้ดีขึ้น แต่ในขั้นตอนการสกัดคานามัยซิน จะมีการสูญเสียปริมาณของสารมากกว่าในขั้นตอนอื่นๆ ของขบวนการทำให้บริสุทธิ์ คือจากผลการทดลองในขั้นตอนการสกัดส่วนน้ำใสโดยเติมกรดอะเซติคจะสูญเสียปริมาณคานามัยซินเท่ากับ 18.20 18.20 และ 24.2 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำใสตั้งต้นก่อนปรับพีเอชคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในรูปที่ 21 ดังเช่นรายงานของ Umezawa และคณะ (1960) ได้ทำการปรับพีเอชของส่วนน้ำหมักเท่ากับ 4.5-5.0 ด้วยกรดซัลฟูริก จะทำให้แยกส่วนของเส้นใยออกจากส่วนน้ำใสได้ดีขึ้น แต่ปริมาณคานามัยซินลดลง 4.5 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณคานามัยซินตั้งต้นในน้ำหมักคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ จากการทดลองพบว่าการสูญเสียปริมาณคานามัยซิน ในขั้นตอนการสกัด เนื่องมาจากกรดอะเซติค เข้มข้น 10 นอร์มัล มีผลต่อโครงสร้างของคานามัยซิน โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นในการทดลองจึงทำการปั่นแยกเส้นใย โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะช่วยลดการสูญเสียคานามัยซิน

การทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ มีขั้นตอนดังนี้คือ การผ่านลงคอลัมน์แอมเบอร์ไลต์ IRC-50 การกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ และการตกตะกอนคานามัยซินในรูปซัลเฟต

ในขั้นตอนการผ่านลงคอลัมน์ ใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก เรซินที่ใช้คือ แอมเบอร์ไลต์ IRC-50 จัดเป็นเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวกแบบกรดอย่างอ่อน มีขนาดอนุภาค 200-400 เมช ซึ่งมีรายงานการทำสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ชนิดอื่นให้บริสุทธิ์ โดยใช้เรซินชนิดนี้คือ ฟอร์ติไมซิน (Okachi *et al.*,1977) อิโนสาไมซิน (Tsunakawa *et at.*, 1985) สปอราไรซิน (Deushi *et al.*,1979) เป็นต้น

จากรายงานของ Umezawa และคณะ (1960) ในขั้นตอนการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 แล้วนำสารละลายคานามัยซินที่ได้ผ่านลงคอลัมน์ชนิดเดียวกันนี้ซ้ำอีกหลายครั้ง จะได้คานามัยซินมีความ

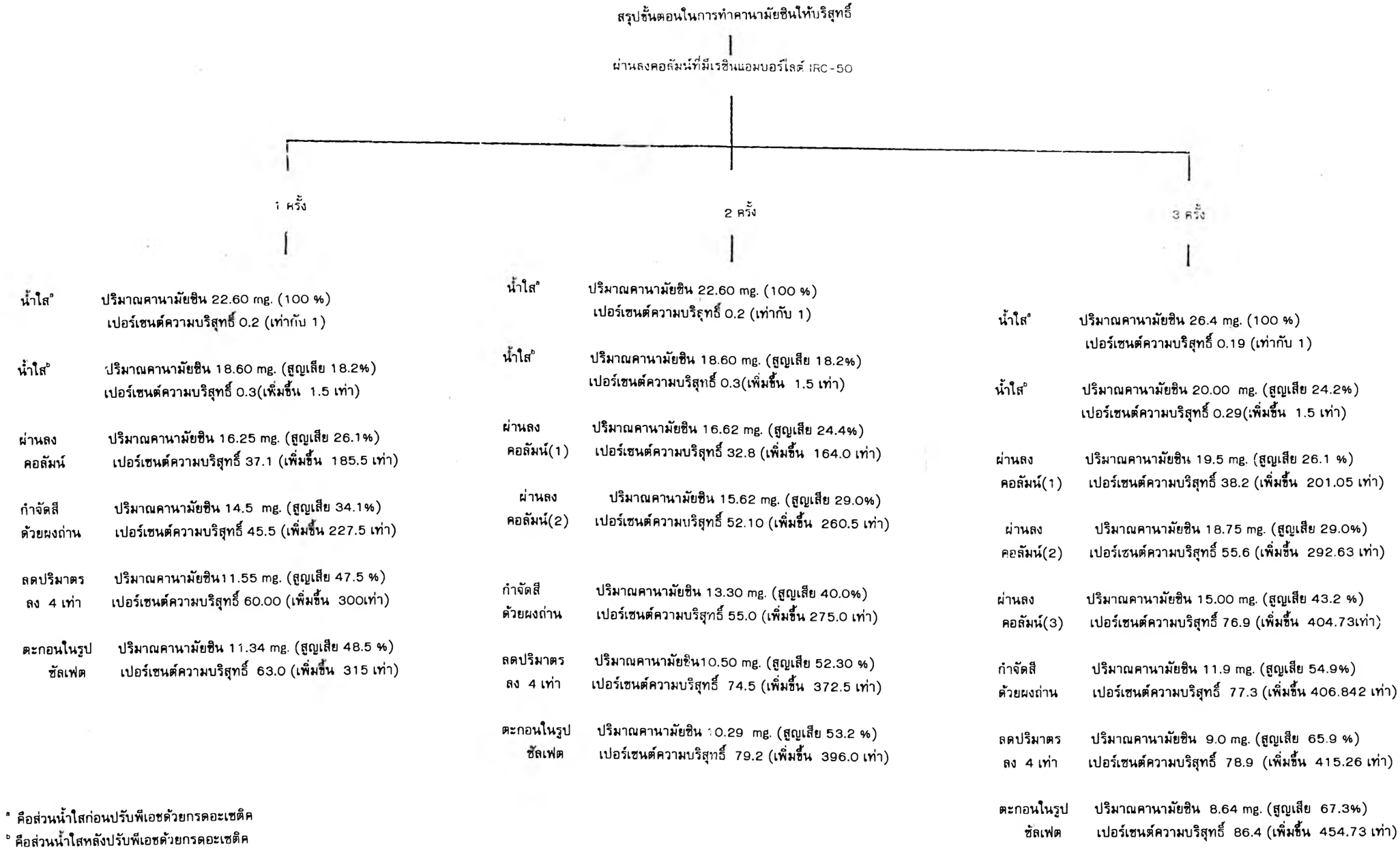
บริสุทธิ์มากขึ้น ในการทดลองนี้จึงมีการแปรจำนวนครั้งที่ผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 1 2 และ 3 ครั้ง โดยเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ และปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา

จากผลการทดลองข้อ 4.2.1 4.2.2 และ 4.2.3 เมื่อแปรจำนวนครั้งของการผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์แอมเบอร์ไลต์ IRC-50 1 2 และ 3 ครั้ง ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของคานามัยซิน จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งที่ผ่านลงคอลัมน์ โดยเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์จะเท่ากับ 63.0 79.2 และ 86.4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แต่ปริมาณคานามัยซินที่สูญเสียไปในขั้นตอนการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับคานามัยซินตั้งต้นในส่วนน้ำใสคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ จะมีเปอร์เซนต์การสูญเสียเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งที่ผ่านลงคอลัมน์คือ 48.5 53.2 และ 67.3 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 21

จำนวนครั้งที่เหมาะสมในการผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์แอมเบอร์ไลต์ IRC-50 เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ และปริมาณการสูญเสียคานามัยซิน โดยเปรียบเทียบกับคานามัยซินตั้งต้นในส่วนน้ำใสคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ พบว่าในการผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ชนิดนี้ 1 และ 2 ครั้ง ความแตกต่างของเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์จะเท่ากับ 16.2 เปอร์เซนต์ และปริมาณการสูญเสียคานามัยซิน ในการผ่านคอลัมน์ 2 ครั้งจะมากกว่าการผ่านคอลัมน์ 1 ครั้งเท่ากับ 4.7 เปอร์เซนต์ ดังนั้นการผ่านคอลัมน์ 2 ครั้งจะมีความเหมาะสมมากกว่าเมื่อคำนึงถึงความบริสุทธิ์ที่ได้ และปริมาณการสูญเสียที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนการผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ชนิดนี้ 3 ครั้ง เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม ถึงแม้ว่าเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์จะสูงถึง 86.4 เปอร์เซนต์ แต่มีการสูญเสียคานามัยซิน ในเปอร์เซนต์ที่สูงมากคือ 67.3 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในรูปที่ 21

เมื่อผ่านขั้นตอนการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 สารละลายคานามัยซินที่ได้จะมีสีเหลือง ซึ่งสีเป็นส่วนที่ปนเปื้อนต้องมีการกำจัด โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ ผงถ่านกัมมันต์นอกจากจะดูดซับสิ่งปนเปื้อน และสีแล้วยังสามารถดูดซับคานามัยซินได้ดีอีกด้วย ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนและกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง ในการกำจัดสีด้วยผงถ่านคือ อุณหภูมิ เวลา ปริมาณผงถ่านที่ใช้ และรูปของสารละลายคานามัยซิน ซึ่งในการหารูปของสารละลายที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 4.1.1 พบว่าคานามัยซินในรูปซัลเฟตจะมีความอยู่ตัวมากกว่าสารละลายคานามัยซินที่ปรับพีเอชเป็นกลางด้วยกรดอะเซติค เมื่อใช้ปริมาณผงถ่าน 0.05 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะกำจัดสีของสารละลายทั้ง 2 รูปได้ไม่หมด โดยในรูปที่ปรับพีเอชเป็นกลางด้วยกรดอะเซติค จะสูญเสียปริมาณคานามัยซิน 53.3 เปอร์เซนต์ มีเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์เท่ากับ 63.6 เปอร์เซนต์ ในรูปซัลเฟตจะสูญเสียปริมาณคานามัยซิน 6.7 เปอร์เซนต์ และมีเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์เท่ากับ 50.0 เปอร์เซนต์



* คือส่วนน้ำใสก่อนปรับพีเอชด้วยกรดอะเซติค
* คือส่วนน้ำใสหลังปรับพีเอชด้วยกรดอะเซติค

รูปที่ 21 ไดอะแกรมสรุปขั้นตอนการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์

และเมื่อใช้ผงถ่านปริมาณ 0.1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะกำจัดสีสารละลายทั้ง 2 รูปได้หมด โดยในรูปที่ปรับพีเอชเป็นกลางด้วยกรดอะเซติค จะสูญเสียปริมาณคานามัยซิน 100 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ในรูปซัลเฟต เมื่อกำจัดสีได้หมดจะสูญเสียคานามัยซิน 13.34 เปอร์เซนต์ และมีเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์เท่ากับ 59.1 เปอร์เซนต์

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกำจัดสีด้วยผงถ่าน แปรผันอุณหภูมิที่ 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองข้อ 1.2 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณคานามัยซินเหลืออยู่ใกล้เคียงกัน คือ 80.0 และ 76.9 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์เท่ากับ 40.0 และ 45.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น่าจะเหมาะสมมากกว่า เพราะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องซึ่งสะดวกต่อการทดลอง

ส่วนเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดสีด้วยผงถ่าน แปรผันเวลาที่ 10 20 และ 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณผงถ่านที่เท่ากัน จากผลการทดลองข้อ 4.1.3 พบว่าที่เวลา 30 นาที จะกำจัดสีได้หมด และมีปริมาณคานามัยซินเหลืออยู่เท่า 83.30 เปอร์เซนต์ มีเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์เท่ากับ 48.1 แต่เวลาที่ 10 และ 20 นาที จะกำจัดสีได้ไม่หมด

ปริมาณผงถ่านที่ใช้ในการกำจัดสี ถ้าใช้มากจะกำจัดสีได้ดี แต่ผงถ่านจะดูดซับสารปฏิชีวนะได้ดีด้วย แต่ถ้าปริมาณผงถ่านน้อย การขจัดสิ่งปนเปื้อนจะไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงมีการแปรผันปริมาณผงถ่านที่ใช้ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จากผลการทดลองข้อ 4.1.4 พบว่าปริมาณผงถ่านที่ใช้ 0.1-0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการกำจัดสี

การตรวจสอบคานามัยซิน โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี จากผลการทดลองพบว่า การตรวจสอบสารตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต พบว่าสารละลายทั้ง 3 ระบบ มีเพียงระบบ ก. ที่มีตัวทำละลาย คือ คลอโรฟอร์ม ต่อ เมธานอล ต่อ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 2:1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) โดยใช้ส่วนบนของตัวทำละลาย เมื่อตรวจสอบด้วยนินไฮดริน จะมีค่า R_f ของสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต เท่ากับ 0.62 ลักษณะแถบเป็นจุด และค่า R_f ของคานามัยซินเท่ากับ 0.56 ลักษณะของแถบเป็นหาง จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า สารตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ไม่ใช่สารชนิดเดียวกันกับสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต

การตรวจสอบคานามัยซิน ด้วยวิธี IR เมื่อนำคานามัยซินซัลเฟตที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบด้วยเทคนิค IR อินฟราเรดสเปกตรัมของคานามัยซินซัลเฟต ดังแสดงในรูปที่ 15 และอินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต แสดงไว้ในรูปที่ 16 จาก อินฟราเรดสเปกตรัมของคานามัยซินซัลเฟต พบพีกของ -OH ที่ประมาณ 3200 cm^{-1} และพีก C-O stretching ที่ประมาณ 1100 cm^{-1} และพีกทั้งสองมีลักษณะคล้ายคลึงกับพีกที่พบในสารมาตรฐานคานามัยซินเอซัลเฟต

แสดงว่าคานามัยซินซัลเฟต มีโครงสร้างหลักเป็นพวกโพลีไฮดรอกซี เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน คานามัยซินเอ ซัลเฟต แต่ทั้งนี้การตรวจสอบโครงสร้างด้วย FT-IR ยังบอกรายละเอียดของโครงสร้างได้ไม่มากนัก

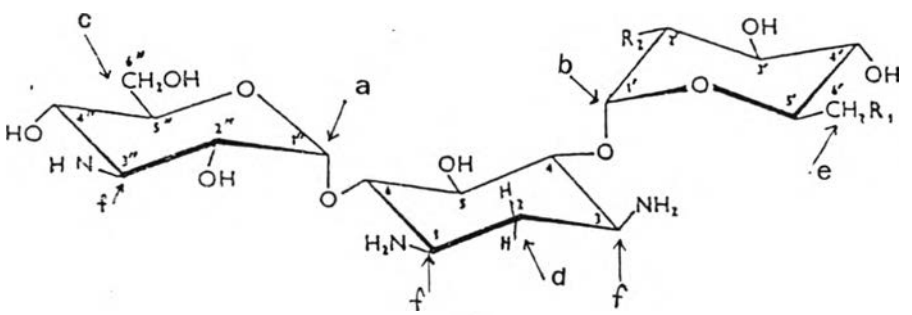
การตรวจสอบด้วยวิธี NMR เมื่อเปรียบเทียบ ^{1}H NMR สเปกตรัมของคานามัยซินซัลเฟต ดังแสดงในรูปที่ 17 และ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต ดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่าคานามัยซินซัลเฟตมีส่วนคล้ายคลึงกับสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต โดยมี anomeric โปรตรอน ซึ่งปรากฏพีกชัดเจนที่ δ 5.15 และ δ 5..5 ppm และ ^{13}C NMR ของคานามัยซินซัลเฟต และสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต ดังแสดงในรูปที่ 19 และ 20 ตามลำดับ แสดง anomeric คาร์บอน ที่ตำแหน่ง δ 99.2 และ δ 103.0 ppm ตามลำดับ แสดงว่าคานามัยซินซัลเฟต มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 3 วง เช่นเดียวกับคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน นอกจากนี้ ^{13}C NMR สเปกตรัมของคานามัยซิน แสดงให้เห็นว่ามีหมู่ $-CH_2-OH$ 1 หมู่ (δ 62.6 ppm) $-CH_2-$ 1หมู่ (δ 32.1 ppm) และ CH_2-NH_2- อีก 1 หมู่ (δ 43.2 ppm) และยังแสดงหมู่ $-CH-NH_2$ อีก 3 หมู่ (δ 50.8, 52.7, และ 57.7 ppm) ซึ่งยืนยันว่าคานามัยซิน ควรมีโครงสร้างหลักเช่นเดียวกับสารมาตรฐานคานามัยซียเอ ดังแสดงในรูปที่ 22 จากการตรวจสอบโครงสร้างด้วย NMR สรุปได้ว่าคานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มคานามัยซิน ซึ่งน่าจะเป็นอนุพันธ์หนึ่งของคานามัยซิน

จากผลการทดลองในการทำคานามัยซิน จาก *S. kanamyceticus* UUNNK1 ให้บริสุทธิ์ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจในระดับหนึ่ง คือสามารถทำให้สารมีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จะมีการสูญเสียปริมาณของสารในเปอร์เซนต์ที่ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับส่วนน้ำใสตั้งต้นคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ จากการวิเคราะห์สารด้วยวิธี HPLC ไม่ประสบผลสำเร็จ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบปริมาณคานามัยซินโดยวิธีทางเคมี และวิธีทางจุลชีววิทยาได้ ซึ่งวิธีทางจุลชีววิทยาผลที่ได้มีความแปรปรวนมาก ดังนั้นปริมาณของคานามัยซินที่วิเคราะห์อาจจะน้อยหรือมากกว่าค่าที่เป็นจริง แต่วิธีทางจุลชีววิทยาเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถติดตามสารปฏิชีวนะในกรณีที่ยังไม่ทราบว่าเป็นสารปฏิชีวนะชนิดใด

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR พบว่าสารปฏิชีวนะที่ได้เป็สารประกอบที่มีวงแหวน 3 วง เป็นโพลีไฮดรอกซีคล้ายกันกับกลุ่มคานามัยซิน จึงคาดว่าเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มคานามัยซิน แต่ไม่แสดงโครมาโตแกรมที่เหมือนกับคานามัยซินเอ ซัลเฟต ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน ดังนั้นสารนี้จึงไม่ใช่ คานามัยซินเอ ซัลเฟต แต่จากข้อมูลของ NMR สเปกตรัมที่ไม่เพียงพอ จึงไม่สามารถแสดงโครงสร้างที่แน่นอนของสารชนิดนี้ได้ ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาและวิจัยต่อไป ดังนั้นจากงานวิจัยนี้ จึงสรุปได้สารปฏิชีวนะ ซึ่งได้จากเชื้อ *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1 อาจจะเป็นอนุพันธ์หนึ่งของคานามัยซิน

ทั้งนี้เนื่องจากความไม่พร้อมของเครื่องมือ และปัจจัยอื่นบางประการ ทำให้การทดลองนี้ไม่สามารถแยกอนุพันธ์ของสารแต่ละชนิดได้ อย่างไรก็ดี ข้อมูลที่ได้จากการ

ทดลองนี้ เช่น วิธีที่เหมาะสมของการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ ภาวะที่เหมาะสมของการกำจัดสีด้วยผงถ่าน การแก้ปัญหาการสูญเสียปริมาณของสารระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ และวิธีการตรวจสอบโครงสร้างของสาร ซึ่งข้อมูลต่างๆ เหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์และพัฒนาการทำสารปฏิชีวนะในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับสารปฏิชีวนะชนิดนี้ให้บริสุทธิ์ได้



รูปที่ 22 โครงสร้างหลักของคานามัยซิน เอ (Korzybski *et al.*, 1967)

a คือ anomeric proton

b คือ anomeric carbon

c คือ หมู่ $-CH_2-OH$

d คือ หมู่ $-CH_2-$

e คือ หมู่ $-CH_2-NH_2$

f คือ หมู่ $-CH-NH_2$