บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (shaker) รุ่น G10-Gyrotory บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific Supply Co. Ltd., Thailand.
- เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) บริษัท Eyela Tokyu Rikakikai Co. Ltd., Japan.
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K บริษัทแบงเทรดดิ้ง
- ตู้อบระบบสุญญากาศ (vacuum oven) บริษัท Hotpack Corp., Philadelphia.
- เครื่อง ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิดโครมาโตกราฟี รุ่น LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan.
- ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D 0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Novaspec II บริษัท Pharmacia Biotech, England.
- ถาดกระจกขนาดกว้าง 19 เซนติเมตร ยาว 31 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร
- ฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร บริษัท Boeco, West Germany.
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co. Ltd., Japan.
- เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany.
- ตู้ดูดอากาศ
- เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Vortex-2 Genie model G-560E บริษัท Scientific Industries, U.S.A.
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan, Singapore.

- แทงค์ (tank) สำหรับ TLC บริษัท Shandon Southern TLC Chromathank, Germany.
- เครื่องเก็บสารลำดับส่วน (fraction collector) รุ่น Frac-200 บริษัท Pharmacia Fine Chemical, Sweden.
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV/vis spectrophotometer) รุ่น PR-1 ของบริษัท Shimadzu, Japan.

3.2 สารเคมี

- คานามัยซินเอ ซัลเฟต (kanamycin A sulfate) บริษัทไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล
- อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.
- แอมเบอร์ไลต์ (Amberlite) IRC-50 บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.
- โดเวกซ์ (Dowex) 1X2 บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.
- ไดอะไอออน (Diaion) WA-30 บริษัท Supelco, U.S.A.
- ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) บริษัท Riedel-DieHaen
- นินไฮดริน (ninhydrin) บริษัท Riedel-DieHaen
- ไพริดีน (pyridine) บริษัท E. Merck

วิธีดำเนินการวิจัย

3.3 **จุลินทรีย์**

3.3.1 *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1

3.3.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

3.4 **การเก็บรักษาจุลินทรีย์**

3.4.1 การเตรียมและเก็บรักษาสปอร์จาก *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1

ขีด (streak) สปอร์หรือไมซีเลียมของเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียงเอ็มเอส (MS agar, ภาคผนวก ก หมายเลข 6) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 7-10 วัน เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3-5 มิลลิลิตร ใช้ลูป (loop) ขูดเบาๆ ให้สปอร์หลุด กรองสปอร์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่นด้วยชุดกรอง นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง แขวนลอยสปอร์ที่ได้ใน 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของกลีเซอรอลในน้ำกลั่น โดยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสปอร์แขวนลอยเป็น 10^8-10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเก็บรักษา *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

เขี่ยเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ลูปลากลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงเอ็มวัน (M1 agar, ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว จึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ เพื่อเก็บรักษาอีกทุกๆ 1 เดือนโดยวิธีเดียวกันนี้

3.5 **การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์**

3.5.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* UUNNK1

นำ *S. kanamyceticus* UUNNK1 อายุ 7-10 วัน ซึ่งมีสปอร์เจริญเต็มที่ ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารวุ้นเอียงเอ็มเอส เติมสารละลายทวีนเอทตี (tween 80) ปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 0.01% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองด้วยชุดกรองโดยวิธีการแบบปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยสารละลายนอร์มัลซาลีน (0.85 % NaCl (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometer)

3.5.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของ *S. aureus*

นำ *S. aureus* อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียงเอ็มวัน มาเติมสารละลายนอร์มัลซาลีน 10 มิลลิลิตร เขี่ยเชื้อให้หลุดเป็นเซลล์แขวนลอย นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เจือจางจนวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.1

3.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ *S. kanamyceticus* UUNNK1

นำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* UUNNK1 ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวจีพีวาย (GPY medium, ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี (rotary shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอก และใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

3.6.2 การเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* UUNNK1 ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าเพื่อผลิตคานามัยซิน

นำ *S. kanamyceticus* UUNNK1 ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี (KPMB medium, ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

3.7 การศึกษาความสามารถในการผลิตคานามัยซินของ *S. kanamyceticus* UUNNK1

3.7.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยวิธีการแพร่ (Linton, 1983)

3.7.1.1 การวัดความสามารถในการผลิตคานามัยซิน ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี

3.7.1.1.1 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบชั้นที่มีเซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบ

นำเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538P ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2 ใส่ลงในอาหารวุ้นเอ็มไฟว์ (M5 agar, ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส

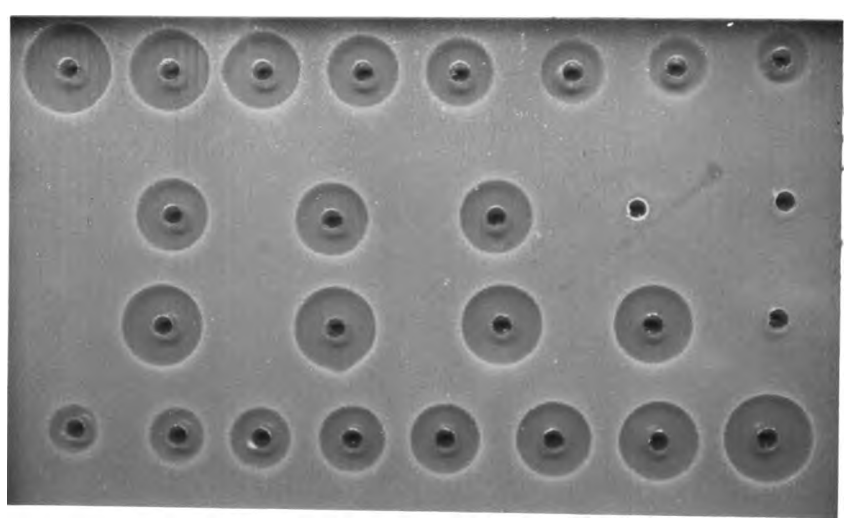
เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายทั่วอาหารแล้วเทลงบนถาดกระจก เอียงถาดกระจกให้อาหารวุ้นกระจายทั่วถาด และมีผิวหน้าเรียบสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว

3.7.1.1.2 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำ *S. kanamyceticus* UUNNK1 ที่เจริญในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.6.2 นำไปปั่นแยกเส้นใยและตะกอนออกจากส่วนน้ำใส (supernatant) โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินต่อไป

3.7.1.1.3 การหาปริมาณคานามัยซิน

นำที่เจาะวุ้น (cork borer) เจาะวุ้นที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.7.1.1.1 หยอดตัวอย่างที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.7.1.1.2 และคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ด้วยไมโครปิเปต (micro-pipette) ให้เต็มหลุมที่เจาะ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา16-18 ชั่วโมง วัดความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบรอบหลุมที่เจาะ ดังรูปที่ 7 เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณคานามัยซินกับกราฟมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค หมายเลข 4) (ในการหาปริมาณคานามัยซินในตัวอย่าง ต้องทำคานามัยซินเอ ซัลเฟตมาตรฐาน ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง)



รูปที่ 7 การวัดปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาของ *S. kanamyceticus* UUNNK1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี

3.8 การสกัดคานามัยซิน จากน้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำน้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.6.2 ปรับพีเอชเท่ากับ 3.0 ด้วยกรดอะเซติค 10 นอร์มัล แล้วนำไปปั่นแยกเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปรับพีเอชของส่วนน้ำใสให้เท่ากับ 7.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มัล กรองแยกตะกอนที่ยังเหลืออยู่ในส่วนน้ำใสด้วยกระดาษกรองวัตแมนเบอร์ 1

3.9 การทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์

3.9.1 การเตรียมคอลัมน์

นำส่วนน้ำใสที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.8 หรือสารละลายคานามัยซินที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ ทดสอบหาปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาตรของเรซินที่ใช้บรรจุลงคอลัมน์ (ภาคผนวก ค หมายเลข 3) ขั้นตอนในการเตรียมคอลัมน์ คือ การเตรียมเรซิน การคำนวณปริมาตรของเรซินที่ใช้บรรจุลงคอลัมน์และการทำเรซินให้สมดุลย์ (equilibrium) (ภาคผนวก ค หมายเลข 1 และ 3)

3.9.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการใช้ผงถ่านกัมมันต์กำจัดสี

สารละลายคานามัยซินที่ได้จากการผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 1 ครั้ง นำมาหาภาวะที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อน และสีของสารละลายคานามัยซิน โดยแปรผันปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ รูปของสารละลาย อุณหภูมิ เวลา ปริมาณของผงถ่าน ซึ่งผลการทดลองที่ได้ จะนำไปใช้ในขั้นตอนการกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ ในการทดลองหาจำนวนครั้งที่ผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50

3.9.2.1 รูปของสารละลายคานามัยซิน

เปรียบเทียบสารละลายคานามัยซินในรูปของซัลเฟต และรูปของสารละลายที่ปรับพีเอชเป็นกลางด้วย 10 นอร์มัล ของกรดอะเซติค โดยนำสารละลายคานามัยซินที่ได้จากการผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 1 ครั้ง แบ่งสารละลายคานามัยซินเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับพีเอชเป็นกลางด้วย 10 นอร์มัล กรดอะเซติค ส่วนที่ 2 ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย 5 นอร์มัล กรดซัลฟูริก จะได้สารละลายคานามัยซินในรูปซัลเฟต นำสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้กำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ โดยใช้ผงถ่านในปริมาณ 0.05 และ 0.1 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทั้ง 2 ชนิด กวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนที่มีแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองแยกผงถ่าน นำสารละลายคานามัยซินที่กำจัดสีแล้ว เปรียบเทียบปริมาณกับสารละลายคานามัยซิน

I19637061

ก่อนกำจัดสีด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 และผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้เป็นรูปของสารละลายคานามัยซินที่เหมาะสมในการศึกษาถึงปัจจัยของอุณหภูมิ เวลา และปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมในการกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์

3.9.2.2 อุณหภูมิ

นำสารละลายคานามัยซินซัลเฟต มาขจัดสิ่งปนเปื้อนและ สีด้วยผงถ่านกัมมันต์ โดยแปรผันอุณหภูมิที่ 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาดูดซับ 30 นาที ปริมาณผงถ่าน 0.1 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร โดยผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหาภาวะต่างๆ ต่อไป

3.9.2.3 เวลา

นำสารละลายคานามัยซินซัลเฟต มาขจัดสิ่งปนเปื้อน และสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ โดยแปรผันเวลาที่ 10 20 และ 30 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณผงถ่าน 0.1 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร

3.9.2.4 ปริมาณของผงถ่าน

นำสารละลายคานามัยซินซัลเฟต มาขจัดสิ่งปนเปื้อน และสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ โดยแปรผันปริมาณผงถ่านที่ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

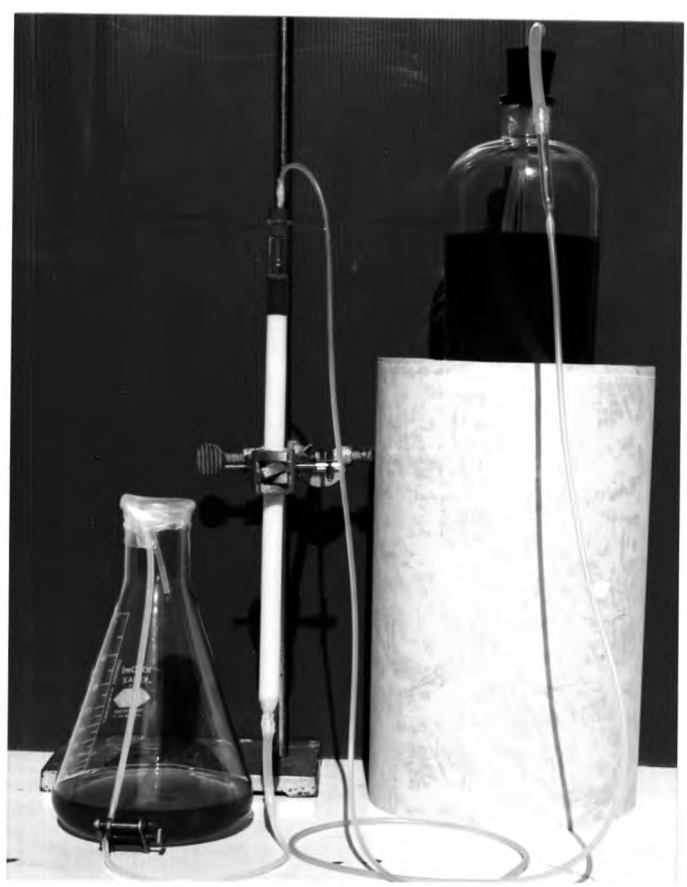
3.9.3 หาจำนวนรอบในการผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ต่อการเพิ่มความบริสุทธิ์ของคานามัยซิน

ทำการทดลองโดยแปรจำนวนครั้ง ที่ผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 1 2 และ 3 ครั้ง หลังจากนั้นกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ และเก็บในรูปตะกอนซัลเฟต

3.9.3.1 การทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 1 ครั้ง

นำส่วนน้ำใสที่เตรียมได้จากข้อ 3.8 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผ่านลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ในรูปโซเดียม ซึ่งเตรียมคอลัมน์ได้ตามวิธีทดลองข้อ 3.9.1 โดยคำนวณปริมาณของคานามัยซิน ต่อปริมาตรของเรซินที่ใช้ มีอัตราการไหลของส่วนน้ำใสผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 8 คานามัยซินมีประจุบวกจะถูกดูดซับไว้โดยเรซิน จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร มีอัตราการไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที นำส่วนน้ำไหลที่ไม่ถูกดูดซับไว้โดยเรซิน ตรวจหาคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 ถ้าหากเรซินจับคานามัยซินได้ไม่หมด ต้องนำส่วนน้ำไหลนั้นมาผ่านลงคอลัมน์ที่มีเรซินชนิดนี้ซ้ำอีกครั้ง โดยเตรียมคอลัมน์ใหม่ ถ้าเรซินจับคานามัยซินได้หมด ขั้นตอนต่อไปคือ ชะคอลัมน์ด้วย 2 นอร์มัล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ มีอัตราการไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแต่ละลำดับ

ส่วน (fraction) ด้วยเครื่องเก็บสารลำดับส่วน (fraction collector) ลำดับส่วนละ 2.5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 40 ลำดับส่วน ดังแสดงในรูปที่ 9 นำแต่ละลำดับส่วนวัดพีเอชด้วยกระดาษวัดพีเอช และนำไปหาปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตี ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย 5 นอร์มัล กรดซัลฟูริก จากนั้นนำมากำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ ซึ่งใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้ทำการศึกษาในข้อ 3.9.2 คือสารละลายคานามัยซินอยู่ในรูปซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที กรองแยกผงถ่าน นำสารละลายคานามัยซินซัลเฟตที่กำจัดสีแล้ว ทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ได้ปริมาตรลดลง 4 เท่าของปริมาตรตั้งต้น แล้วเก็บคานามัยซินให้อยู่ในรูปตะกอนซัลเฟต โดยการเติม 95 เปอร์เซนต์ เมธานอลปริมาตรเป็น 4 เท่าของสารละลาย จะได้ตะกอนของคานามัยซินซัลเฟต นำตะกอนของคานามัยซินซัลเฟต ไปทำให้แห้ง โดยอบในตู้อบระบบสุญญากาศ (vacuum oven) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บในโถแก้วเก็บสารในระบบสุญญากาศ (vacuum desiccator) เพื่อป้องกันความชื้น นำไปชั่งหาน้ำหนักตะกอนของคานามัยซินซัลเฟต ด้วยเครื่องชั่งละเอียด



รูปที่ 8 การผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50

รูปที่ 9 การชะคอลัมน์และเก็บลำดับส่วนของสาร

3.9.3.2 การทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 2 ครั้ง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.9.3.1 โดยเมื่อทำถึงขั้นตอนการผ่านลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 1 ครั้ง หลังจากล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น และชะคอลัมน์ด้วย 2 นอร์มัล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตี แล้วปรับพีเอชสารละลายคานามัยซินให้เป็นกลางด้วย 10 นอร์มัล ของกรดอะเซติค หาปริมาณของสารละลายคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 เตรียมคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ในรูปโซเดียม ตามวิธีทดลองข้อ 3.9.1 โดยคำนวณปริมาณของคานามัยซิน ต่อปริมาตรเรซินที่ใช้ ผ่านสารละลายคานามัยซินลงคอลัมน์ที่มีเรซินชนิดนี้ครั้งที่ 2 มีอัตราการไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีอัตราการไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที นำส่วนน้ำไหลที่ไม่ถูกดูดซับไว้โดยเรซิน ตรวจหาคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 ถ้าหากเรซินจับคานามัยซินได้ไม่หมด ต้องนำส่วนน้ำไหลนี้มาผ่านลงคอลัมน์ชนิดนี้ซ้ำอีกครั้ง โดยเตรียมคอลัมน์ใหม่ถ้าเรซินจับคานามัยซินได้หมด ขั้นตอนต่อไปคือชะคอลัมน์ด้วย 2 นอร์มัล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ มีอัตราการ

ไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บลำดับส่วนละ 2.5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 40 ลำดับส่วน นำแต่ละลำดับส่วน วัดค่าพีเอช และหาปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตี นำสารละลายคานามัยซินปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย 5 นอร์มัล ของกรดซัลฟูริก จะได้สารละลายคานามัยซินซัลเฟต กำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ ทำให้เข้มข้นด้วยการลดปริมาตรลง 4 เท่า เก็บคานามัยซินในรูปตะกอนซัลเฟต และทำให้แห้งเช่นเดียวกันกับวิธีทดลองข้อ 3.9.3.1

3.9.3.3 การทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 3 ครั้ง

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.9.3.2 โดยเมื่อทำถึงขั้นตอนการผ่านลงคอลัมน์ที่มีแอมเบอร์ไลต์ IRC -50 ครั้งที่ 2 หลังจากล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น และชะคอลัมน์ด้วย 2 นอร์มัล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตี แล้วปรับพีเอชของสารละลายคานามัยซินให้เป็นกลางด้วย 10 นอร์มัล ของกรดอะเซติค หาปริมาณของสารละลายคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 เตรียมคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ตามวิธีทดลองข้อ 3.9.1 โดยคำนวณหาปริมาณของคานามัยซิน ต่อปริมาตรของเรซินที่ใช้ ผ่านสารละลายคานามัยซินลงคอลัมน์ที่มีเรซินชนิดนี้ครั้งที่ 3 มีอัตราการไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีอัตราการไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที นำส่วนน้ำไหลที่ไม่ถูกดูดซับไว้โดยเรซิน ตรวจหาคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 ถ้าหากเรซินจับคานามัยซินได้ไม่หมด ต้องนำส่วนน้ำไหลนี้ผ่านลงคอลัมน์ชนิดนี้ซ้ำอีกครั้ง โดยเตรียมคอลัมน์ใหม่ ถ้าเรซินจับคานามัยซินได้หมด ขั้นตอนต่อไปคือชะคอลัมน์ด้วย 2 นอร์มัล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ มีอัตราการไหลผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บลำดับส่วนละ 2.5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 40 ลำดับส่วน นำแต่ละลำดับส่วน วัดค่าพีเอช และหาปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1 รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตี นำสารละลายคานามัยซินที่ได้ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย 5 นอร์มัล ของกรดซัลฟูริก จะได้สารละลายคานามัยซินซัลเฟต กำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ ทำให้เข้มข้นด้วยการลดปริมาตรลง 4 เท่า เก็บคานามัยซินในรูปตะกอนซัลเฟต และทำให้แห้งเช่นเดียวกันกับวิธีทดลองข้อ 3.9.3.1

3.10 การตรวจสอบคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา

ตะกอนของคานามัยซินซัลเฟตที่ได้จากข้อ 3.9.3.1 ข้อ 3.9.3.2 และข้อ 3.9.3.3 นำมาทดสอบหาปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 3.7.1

3.11 การตรวจสอบคานามัยซิน ด้วยวิธีทางเคมี

ตะกอนของคานามัยซินซัลเฟตที่ได้จากข้อ 3.9.3.1 ข้อ 3.9.3.2 และข้อ 3.9.3.3 นำมาตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมี โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต ของบริษัทไทยเมจิฟาร์มาซูติคอล ด้วยวิธีต่อไปนี้

3.11.1 วิธีไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (Gambardella *et al.*,1985)

3.11.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตะกอนของคานามัยซินซัลเฟตที่ได้จากการทดลอง และคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐานมาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.01-0.15 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเตรียมเป็นอนุพันธ์ที่ดูดกลืนแสงได้ที่ 350 นาโนเมตร โดยเติมกรดไตรไนโตรเบนซีนซัลโฟนิก เข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมไพริดิน (pyridine) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นด้วยน้ำประปา แล้วเติมอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ผสมกันดังกล่าวปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินด้วยเครื่อง HPLC

3.11.1.2 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

คอลัมน์ : Lichrocarp C_{18} reverse phase ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใน 0.4 เซนติเมตร ยาว 12.5 เซนติเมตร

สารละลายตัวพา : 0.02 โมลาร์ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ต่อ อะซิโตไนไตรล์ต่อเมธานอล เท่ากับ 40:46:15 (ปริมาตรต่อ ปริมาตร ต่อ ปริมาตร)

อัตราการไหล : 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิ : 45 องศาเซลเซียส

ตรวจวัด : เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี วิสิเบิล ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

3.11.2 วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

เตรียมตัวอย่างโดยนำตะกอนของคานามัยซินซัลเฟต ที่ได้จากการทดลองและสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปหยด (spot) บนแผ่นซิลิกาขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 20

เซนติเมตร จุดละ 5 ไมโครลิตร นำไปอบในถังโครมาโตกราฟีที่อิ่มตัวด้วยสารผสมของตัวทำละลาย สารละลายที่ใช้คือ

ก. คลอโรฟอร์ม ต่อ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ต่อ เมธานอล (ใช้ส่วนบน) เท่ากับ 2:1:1 (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร ต่อ ปริมาตร)

ข. 10 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมอะซีเตท ต่อ เมธานอล เท่ากับ 1:1 (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร)

ค. เอ็น-บิวทานอล ต่อ เอธานอล ต่อ คลอโรฟอร์ม ต่อ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 4:5:2:5 (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร)

เมื่อตัวทำละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร ปล่อยให้แห้งแล้วตรวจแถบที่สารเคลื่อนที่ โดยพ่น 0.2 เปอร์เซนต์ของนินไฮดรินที่ละลายในบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดจุดสีน้ำตาลม่วง วัดค่า R_f คือระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Umezawa, 1986)

3.11.3 วิธีอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี (Infrared spectroscopy, IR)

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11.4 วิธีนิวเคลียร์ แมกเนติค เรโซแนนซ์ (Nuclear magnetic resonance, NMR)

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย