รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ควบคุมอาหารและยา, กอง. 2535. บริษัทที่ผลิต และนำเข้ายาปฏิชีวนะในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: กองควบคุมอาหารและยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข. (อัดสำเนา).

ไทยเมจิฟาร์มาซูติคอล, บริษัท. 2538. คานามัยซิน เมจิ. เอกสารกำกับยา. กรุงเทพมหานคร: ไทยเมจิฟาร์มาซูติคอล จำกัด (อัดสำเนา).

มาลิน จุลศิริ. 2532. ยาต้านจุลชีพ: ความรู้พื้นฐานและประยุกต์ พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต.

ลิวินเนอร์ ฟาร์มาซูติคอล, บริษัท. 2538. คานามัยซิน. เอกสารกำกับยา. กรุงเทพมหานคร: ลิวินเนอร์ ฟาร์มาซูติคอล จำกัด (อัดสำเนา).

วีระ ศิลปสุวรรณชัย. นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 6. สัมภาษณ์, 20 กันยายน 2535.

ภาษาอังกฤษ

American Medical Association Council on Drugs. 1965. New drugs. Chicago: n.p.

Ashwell, G., 1966. New colorimetric methods of sugar analysis. Methods in enzymology. vol. 8. New York: Academic Press.

Aver, C. J. 1984. Genetics 2nd ed. Boston: Willard Grant Press.

Balen, V. C. 1965. Mutation of the blue-green agla, *Anacystis nidulans.* Science, N. Y. 149: 70.

Basak, K., and Majumdar, S. K. 1973. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. Antimicrob. Agents Chemother. 4(1): 6-10.

_____ and Majumdar, S. K. 1975. Mineral nutrition of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin formation. Antimicrob. Agents Chemother. 8(4): 391-395.

Blatz, R. H. 1980. Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces.* Dev. Ind. Microbiol. 4:43-54.

Botstein, D., and Jone, E. W. 1969. Nonrandom mutagenesis of the *Escherichia coli* genome by nitrosoguanidine. J. Bacteriol. 98: 847-848.

Brinbery, S. L., Grabovskaya, O. Z., Smirnova, L. V., Papatsenka, V. P., and Kalmykova, G.V. 1970. Respiration of kanamycin-production organism during biosynthesis. Antibiotiki. 15(6): 500-505. (USSR).

Budavari S. 1989. The merck index 11th ed. (centennial edition). New Jersey: Merck & Co., Inc, Rahway.

Crameri, R.., and Davies, J. E. 1986. Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes. J. of Antibiotics. 39(1): 128-35.

Code of federal Regulation. 1987. Title 21, Microbiology assay methods. Part 436.100. $436.31. Food and drug. , FAD. Printing Office, Washington. DC: 269-286.

Craddock, V. M. 1969. Study of the methlylation and lack of determination of deoxy-ribonucleic acid by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. Biochem. 111: 615-620.

Cron, M. J., Fardig, O. B., Johnson, D. J. , Palermiti, F. M., Schmitz, H., and Hooper, I. R. 1958. The chemistry of kanamycin. Ann. NY. Acad. Sci. 76:21-25.

Crueger, W., and Crueger, A. 1987. Biotechnology. New York: Academic Press.

Delic, V., Hopwood, D. A., and Friend, E. J. 1970. Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor.* Mutation Research. 9: 167-182.

Demain, A. L., 1980. Do antibiotics function in nature?. Search. 11: 148-151.

_____ and Piret, J. M. 1981. Why secondary metabolism?. In Microbiology 1981. Schlessinger, S. (Ed.). Washington, D. C.: American Society for Microbiology.

Deutscher, M. P. 1990. Methods in enzymol. vol. 182. New York: Acad. Press.

Drake, J. W. 1970. The molecule basis of mutation. New York: Holden-Day, INC.

Duseeva, N. D., and Zabirova, R. K. 1971. Comparative studies of triethylamine and ethylenimine used in selection of kanamycin-production organisms *Actinomyces kanamyceticus.* Antibiotiki. 16(1): 32-36. (USSR)

Franklin, T. J., and Snew, G. A. 1989. Biochemistry of antimicrobial action. New York: Cham and Hall.

Gambardella, P., Punziano, M., Gionti, M., Guadalupi, C., and Mancini, G. 1985. Quantitative determination and separation of analogues of aminoglycoside antibiotics by High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatography. 348: 229-240.

Garner, H. R., Koffler, H., Tetrault, P. A., Fahmy, M., allett, M. V., Faust, R. A., Phillips, R.. I., and Bohonos, N. 1953. Factors affecting streptomycin yields. Am. J. of Bot. 40: 289-296.

Goldfarb, D. M., Nesterova, G. F., and Kuznetsova, V. N. 1966. Localization of h^+ mutation phage, induce by various mutagens. Soviet Genetics. 2: 19-22.

Goodenough, U., and Paullevine, R. 1974. Genetics. New York: Holt, Rinehart and Winston INC.

Goodfellow, M., Williams, S. T., and Mordarski, M. 1988. Actinomycetes in biotechnology. New York: Acadimic Press.

Goodman, C. S., and Gilman, A. 1975. The pharmacological basis of therapeutics. 5th ed. New York: Macmillan Publishing.

Gottlieb, D. 1976. The production and role of antibiotics in soil. J. Antibiot. 29: 987-1000.

Hashimoto, Y., Kohli, Y., Shimamoto, K., Makajima, M., Torue,S., Miyako, M., Tada, M., and Kawai., K. 1973. Kyoto Furitsu Ikadaigaku-zasshi. 82: 151.

Hays, J. B., Martin, S. J., and Bhatia K. 1985. Repair of nonreplicating UV-irradiated DNA: Cooperative dark repair by *Escherichia coli* Uvr and Phr functions. J. Bacteriology. 161: 602-608.

Hopwood, D. A., Wright, H. M., Bibb, M. J., and Cohen, S. N. 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. Nature. 268: 171-174.

Jawetz, E., Meinick, J. L., and Adelberg, E. A. 1984. Review of medical microbiology. n.p.

Johdo, O., Ishikura, T., and Yoshimoto, A. 1991. Anthracycline metabolism from *Streptomyces* violaceus A262: I. Isolation of antibiotic-blocked mutant from *Streptomyces violaceus* A262. J. Antibiotics. 44(10): 1110-1120.

Katz, E., and Demain, A. L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis and possible functions. Bacteriol Rev. 41: 449-474.

Kelly, F. and Legator, M. 1971. The effect of by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and streptozotocin on mammalian cell cultures. Mutation Res. 12: 183-190.

Khokhlov, A. S., and Tovarova, I. I. 1979. Autoregulator from *Streptomyces griseus.* In: Regulation of secondary production and plant hormone metabolism. New York: Pergamon Press.

Kimura, G., and ulbecco, R. 1972. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of Simian virus 40. Virology. 49: 394-403.

Kobel, H., and Sanglier, J. J. 1973. cited in Genetics of industrial microorganism. vol. II. Amsterdam: Elsevier. 421.

Langley, R. A., and Kado, C. T. 1972. Studies on *Agrobacterium tumefaciens.* Conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and relationships of *Agrobacterium tumefaciens* mutants to crown-gall tumor induction. Mutation Res. 14: 277-286.

Lawley, P. D. 1968. Methylation of DNA by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosourethane and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Nature. 218: 580-581.

Laznikova, O. Z., Brinberg, S. L., Surikova, E. I., Gorskaya, S. V., Listvinova, S. N., and Belikava, N. F. 1976. Importance of the quality of raw material for the biosynthesis of antibiotic. Usp. Obl. Izuch. Proizvod. Antibiot. 1: 39-45. (USSR).

Lindahl, T., Demple, B., and Robin, P. 1982. Suicide inactivation of the *E. coli* O^6-methylguanidine-DNA transferase. J. EMBO. 1: 1359-1363.

Livingston, L. 1981. Genetics: A molecular approach. New York: Macmillan.

Mandell, J. D., and Greenberg, J. 1960. A new chemical mutagen for bacteria N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3 (6): 575-577.

Mckay, A. F., and Wright, G. F. 1947. Preparation and properties of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. Am. Chem. Soc. 69: 3028-3030.

Megnet, R. 1965. Screening of auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces* pombe with 2-deoxyglucose. Mutation Res. 2: 328-331.

Miller, B. M., and Litsky, W. 976. Industrial microbiology. New York: McGrwa-Hill Book Company.

Murakami, T., Nojiri, C., Toyama, H., Hayashi, E., Katumuta, K., Anzai, H., atsuhashi, Y., Yamada, Y., and Nagaoka, K. 983. Cloning of antibiotic resistance genes in *Streptomyces*. J. of Antibiotics. 36: 1305-1311.

Naba, P. M. 1969. Temperature sensitive conditional mutants of monkey kidney cells. Nature, Lond. 223: 1380-1381.

Okanishi, M., Ohta, T., and Umezawa, H. 1970. Possible control of formation of aerial mycelium and antibiotic production in *Streptomyces* by e pisodic factors. J. of Antibiotics. 23: 45-47.

_____ and Umezawa, H. 1978. Plasmid involved in antibiotic production in streptomyces. Genetics of the actinomycetales. Stuttgart: Fischer Verlag.

Piggot, P., and Mandelstam, J. 1973. cited in Genetics of industrial microorganism. vol. I. Amsterdam: Elsevier. 355.

Redei, E. G. 1982. Genetics. New York: Macmillan.

Riviere, J. 1977. Industrial application of microbiology. Great Britain: Thomson Litho Ltd.

Satoh, A., Ogawa, H., and Satomura, Y . 1976. Regulation of N-acetyl kanamycin amidohydrase in the idiophase in kanamycin fermentation. Agriculture and Biological Chemistry. 40: 191-196.

Scancar, G. B., Smith, F. W., Reid, R.., Payne, G., Lery, M., and Scancar, A. 1987. Action mechanism of *E. coli* DNA photolyase. J. Biological Chemistry. 262: 478-498.

Schmitz, H., Fardig, O. B., O'Herron, F. A., Rousche, M. A., and Hooper, I. R. 1958. Kanamycin. III. kanamycin B. J. Am. Chem. Soc. 80: 2911-2912.

Singer, B. and Fraenkel-Conrat, H. 1967. Chemical modification of virus RNA, 6. The action of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 58: 234-239.

Singleton, P., and Sainsbury, D. 1988. Dictionary of microbiology and molecular biology. 2nd ed. Singapore: John Wiley&Sons, Ltd.

Sinha, U., and Chattoo, B. B. 1975. Biological effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. of Scientific & Industrial Research. 34: 499-505.

Smith P., and Keary, P. 1991. Molecular genetic. New York: Macmillan.

Soichiro, T., Nakagawa, S., and Naito, T. 1977. Aminoglycoside antibiotic. X Chemical conversion of kanamycin B to kanamycin C and 6'-deoxy-kanamycin C. J. of Antibiotics. 30(11): 1002-1003.

Stanbury, P. F., and Whitaker, A. 1984. Principle of fermentation technology. Oxford: Pergamon Press.

Strickberger, M. W. 1985. Genetics. 3nd ed. New York: Macmillan.

Shuyun, C., Xuzhang, L., Tianquan, Y., Junwei, C., and Jinfeng, Q. 1983. Relation between alkaline phosphatase isoezyme pattern and kanamycin formation in *Streptomyces kanamyceticus* grown from high- and low-concentration inorganic phosphate media. Wuhan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban. (2): 91-95. (Ch)

Tegtmeyer, P., Dohan, C., and Rezinkoff, C. 1970. Inactivating and mutagenic effects of nitrosoguanidine on Simian virus 40. Proc. Natn. Acad. Sci. US. 66: 745-752.

Tilly, B. C., Testa, R. T., and Dorman, E. 1975. A role of cobalt ions in the biosynthesis of gentamycin. 31st Meeting of the Society for Industrial Microbiology, Abstract no. 26. Kingston. RI. Aug. 17-22.

Umezawa. H., and others. 1957. Production and isolation of a new antibiotic kanamycin. J. of Antibiotic. ser. A. 10(5): 181-188.

_____ . 1958. Kanamycin: Its discovery. Ann. NY. Acad. Sci. 76: 20-26.

_____ , Maeda, K., and Ueda, M. 1960. Kanamycin and process for the preparation thereof. US. Patent Office. 2,931,798: 935-948.

_____ , Kojima, M., and Yamada, Y. 1968. Studies on the biosynthesis of kanamycins. Part I. Incorporation of ^{14}C-glucose or ^{14}C-glucosamine in to kanamycin and kanamycin-related compounds. J. Agr. Biol. Chem. 32(4): 467-473.

_____ . 1968. J. Asian Med. 11(2): 66-77.

Umezawa. H., Kojima, M., and Yamnada, Y. 1969. Studies on the biosynthesis of kanamycins. Part II. Incorporation of the radioactive degradation products of kanamycin A or related metabolities in kanamycin A. J. Agr. Biol. Chem. 33(8) : 1181-1185.

_____ , Hotta, K., and Okami, Y. 1977. Elimination of the ability of a kanamycin-production strain to biosynthesize deoxystreptamine moiety by acriflavine. J. of Antibiotics. 30(12): 1146-1149.

_____ . 1986. Minimum requirements of antibiotic products of Japan. Japan: Japan Antibiotic Research Association.

_____ , Koyama, G., Litaka, Y., and Maeda, K. 1986. Tetrahedron Lett. 15: 1875-1879.

Umezawa, S., Koto, S., Tatsuta, K., and Tsumura, T. 1968. The total synthesis of kanamycin C. Bull. Chem. Soc. Jap. 41: 533.

Umezawa, S., Koto, S., and Tatsuta, K. 1969. Studies of aminosugars. XXII. The total synthesis of kanamycin A. Bull. Chem. Soc. Jap. 42: 533-537.

Vandamme, E. J. 1984. Biotechnology of Industrial antibiotics. (Drugs and the pharmaceutical science: v. 22) New York: Marecl Dekker INC.

Voet, D., and Voet, J. G. 1990. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Wagner, R. P., Judd, B. H., Sanders, B. G., and Richardson, R. H. 1980. Introduction to modern genetics. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Zhao, J. Y., Li, C. Y., Chen, Y. H., and Tu, J. P. 1980. Mutagenic breeding of *Streptomyces kanamyceticus* with NTG. I Ch'uan. 2(3): 17-19 (Ch.)

_____ , and Du, R., 1983. Selection of high yielding strains of *Streptomyces kanamyceticus* by resistant mutant. Kangshengsu. 8(1): 24-28. (Ch.)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วายเอส อการ์ (YS agar) สำหรับเก็บรักษา *Streptomyces kanamyceticus* (Johdo et al., 1991)

แป้ง (starch)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.2 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)

2. เอ็มวัน อการ์ (M1 agar) สำหรับเก็บรักษา *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (Code of federal regulation, title 21, 1987)

แบคโตเปปโตน (bacto-peptone)	6.0	กรัม
เคซีน (casein)	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	1.5	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	1.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5-6.6 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. จีพีวาย มีเดียม (GPY medium) สำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *S. kanamyceticus* (Umezawa et al., 1977)

กลูโคส (glucose)	10.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto-peptone)	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	4.0	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

4. เคพีเอ็มเอ อการ์ (KPMA agar) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus* เพื่อผลิตคานามัยซิน (Umezawa et al., 1977)

กลูโคส (glucose)	1.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_2SO_4.7H_2O$)	2.5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

5. เคพีเอ็มบี มีเดียม (KPMB medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus* เพื่อผลิตคานามัยซิน (Umezawa et al., 1960)

แป้ง (starch)	20.0	กรัม
ถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอ็นไซม์(soytone)	12.0	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_2SO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (sacto-peptone)	3.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

6. เอ็มไฟว์ อการ์ (M5 agar) สำหรับทดสอบปริมาณคานามัยซิน (Code of federal regulation, title 21, 1987)

แบคโตเปปโตน (bacto-peptone)	6.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	1.5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.8-8.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

7. เอ็มเอส อการ์ (MS agar) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus*

ถั่วเหลืองบดละเอียด	20	กรัม
น้ำตาล ดี-แมนนิทอล (D-manital)	20	กรัม
วุ้นผง	18	กรัม

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร และน้ำประปา 500 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. วิธีเตรียม ทริสมาลิอิค บัปเฟอร์ pH 9.0 (Tris-maleic buffer) เข้มข้น 0.05 โมลาร์ เพื่อใช้เตรียมสารละลาย NTG (Delic et al., 1970)

ทริส (Tris)	6.1	กรัม
มาลิอิค (maleic acid)	5.8	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 9.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

2. วิธีเตรียม โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 8.0 (potassium-phosphate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต (Code of federal regulation, title 21, 1987)

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	16.73	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.523	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย โปแตสเซียมไดไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. วิธีเตรียม โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.5 (potassium-phosphate buffer) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในสารละลายตัวพา (mobile phase) ในการวิเคราะห์คานามัยซิน ด้วย HPLC (Deutscher, 1990)

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.22	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.46	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

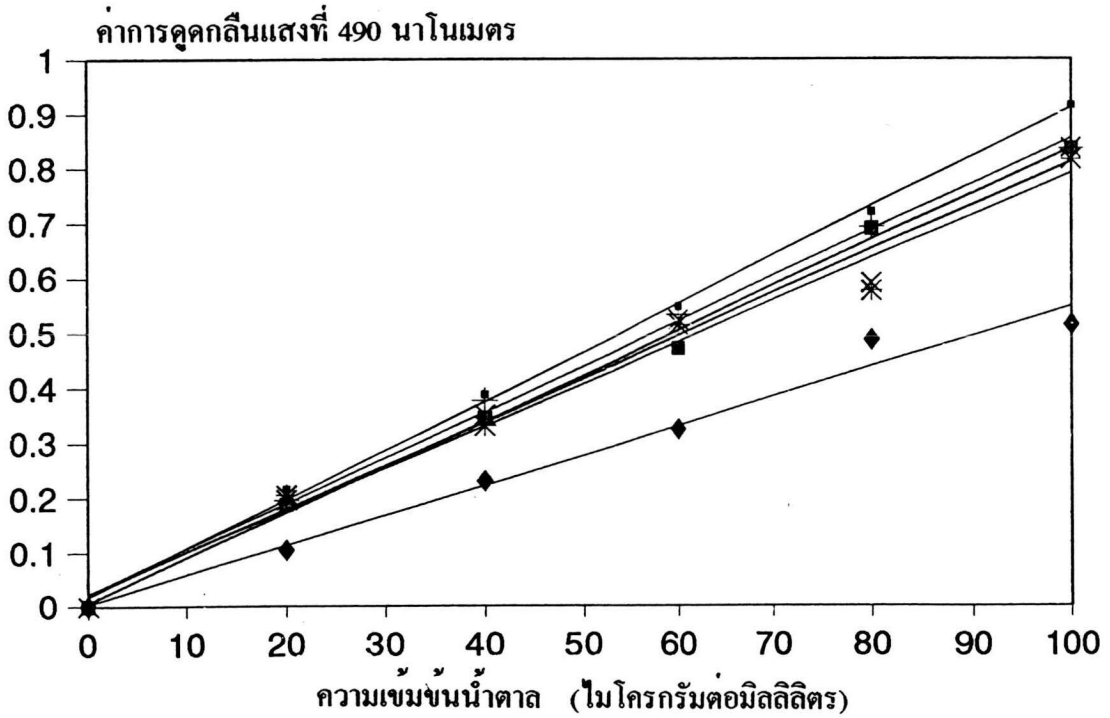
ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย โปแตสเซียมไดไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

ภาคผนวก ค

1. การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริค (Phenol-sulfuric method)

(Ashwell, 1966)

นำตัวอย่างที่ต้องการจะวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอล 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมกรดกำมะถัน (sulfuric acid) เข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าให้ผสมเข้ากัน ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความยาวคลื่นของตัวอย่างที่วัดได้ให้เป็นปริมาณน้ำตาล โดยเทียบกับค่าความยาวคลื่นของกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลบริสุทธิ์ ชนิดเดียวกับน้ำตาลที่ต้องการวัดปริมาณ เข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่วัดปริมาณด้วยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริค เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 48



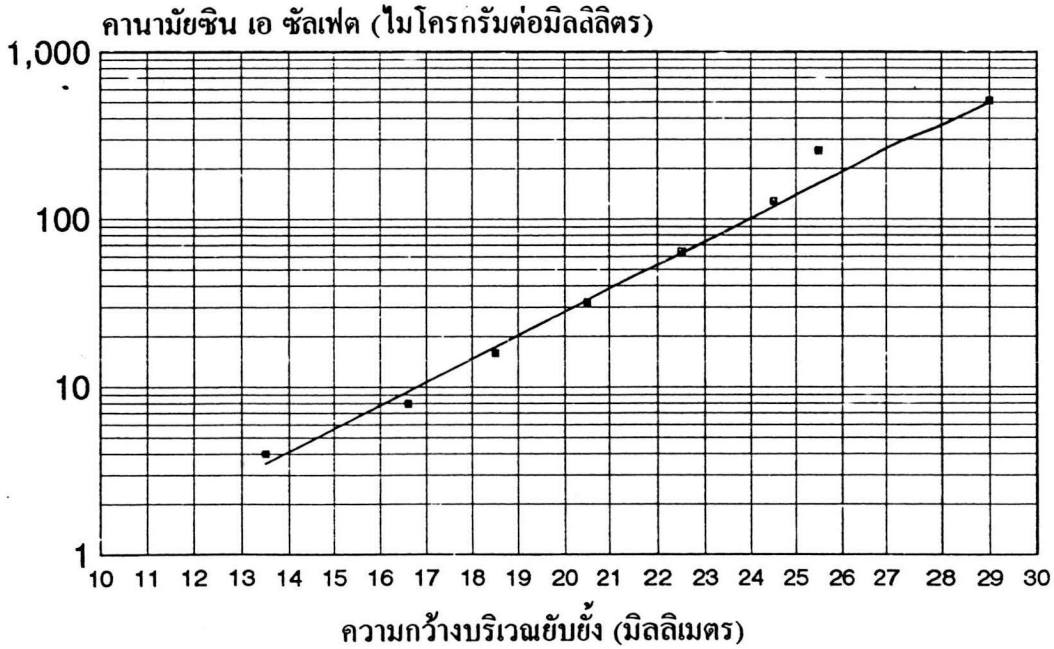
รูปที่ 48 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด เมื่อวัดปริมาณด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค

- หมายถึง แป้ง (ความชัน=0.0092)
- หมายถึง มอลโตส (ความชัน=0.0080)
- หมายถึง แลคโตส (ความชัน=0.0073)
- หมายถึง กลูโคส (ความชัน=0.0086)
- หมายถึง กาแลคโตส (ความชัน=0.0087)
- หมายถึง กากน้ำตาล (ความชัน=0.0047)

2. กราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต

2.1 กราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต โดยวิธีจุลชีววิทยา (Code of federal regulation, title 21, 1987)

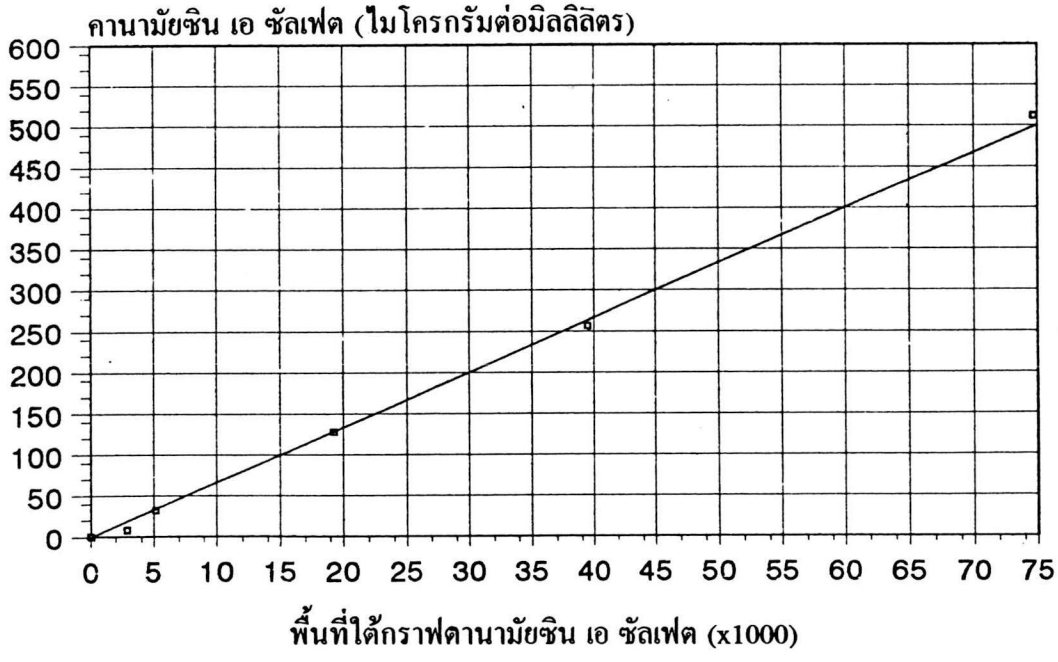
นำสารละลายคานามัยซิน เอ ซัลเฟต เข้มข้น 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 8.0 (potassium phosphate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) นำไปหยอดให้เต็มท่อแสตนเลส (cylinder) ที่วางอยู่บนอาหารทดสอบที่มี *S. aureus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 5.1.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญรอบแท่งแสตนเลส ที่บรรจุสารละลายคานามัยซิน เอ ซัลเฟต แต่ละความเข้มข้น นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน โดยกำหนดให้แกน X เป็นความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง แกน Y เป็นค่าล็อคของความเข้มข้นของสารละลายคานามัยซิน เอ ซัลเฟต ได้ผลดังรูป 49



รูปที่ 49 กราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต โดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

2.2 กราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด-โครมาโตกราฟฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) (Gambardella et al., 1985)

นำสารละลายคานามัยซิน เอ ซัลเฟต เข้มข้น 0, 8, 32, 128, 256 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 8.0 (potassium phosphate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมกรดไตรไนโตรเบนเซนซัลโฟนิก (2,4,6 Trinitrobenzensulphonic acid) เข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติม ไพริดีน (pyridine) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นด้วยน้ำประปา แล้วเติมกรดอะซิติก เข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซิน ด้วยเครื่อง HPLC ตามภาวะในวิธีการทดลองข้อ 5.2.2 นำผลที่ได้มาเขียนกราฟ โดยให้แกน X เป็นพื้นที่ใต้กราฟของ คานามัยซิน เอ ซัลเฟต แกน Y เป็นปริมาณคานามัยซิน เอ ซัลเฟต ได้ผลดังรูป 50



รูปที่ 50 กราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต โดยเครื่อง HPLC

3. <u>การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด</u> (Scanning electron microscope, SEM)

3.1 นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดเป็นชิ้นให้ได้ขนาดที่เหมาะสม นำไปแช่ในน้ำยาดองขั้นที่ 1 (primary fixation) ซึ่งประกอบด้วย 4 เปอร์เซนต์ ของ พาราฟอร์มอลดีไฮด์ (p-formaldehyde) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-18 ชั่วโมง จึงนำมาล้างใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ในน้ำยาดองขั้นที่ 2 (secondary fixation) ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซนต์ ของ ออสเมียมเตรตระออกไซด์ (osmium tetraoxide, OsO_4) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายในตู้ควัน

3.2 การขจัดน้ำออก (dehydration) โดยเทน้ำยาดองขั้นที่ 2 ออก แล้วจุ่มตัวอย่างในเอทธานอลความเข้มข้น 35, 50, 70, 90 และ 100 เปอร์เซนต์ ขั้นตอนละ 10-20 นาที ตามลำดับ

3.3 การทำตัวอย่างให้แห้ง โดยการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical point dryer model SAMDRI-780)

3.4 นำตัวอย่างไปติดบนแท่นทองเหลืองด้วยกาวติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electroconductive adhesive)

3.5 นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Ion sputter coater, model JSC-110

3.6 นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, model JMS-T220A)

(ที่มา : ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ประวัติผู้เขียน

นายศรสดมภ์ ขัติยะวรา เกิดวันที่ 31 สิงหาคม พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีการศึกษา 2534 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2535